

Strukturbasiertes Wirkstoffdesign am Beispiel der Zielproteine HIV-1 Protease, Transglutaminase 2 und Faktor XIII

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Ina Lindemann
aus Peine

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
13.12. 2011 angenommen.

Erstgutachter Prof. Dr. Gerhard Klebe

Zweitgutachter Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Tag der mündlichen Prüfung am 14.12. 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von September 2007 bis Mai 2011 durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Allgemeine Einleitung und Problemstellung	1
2 HIV-1 Protease	6
2.1 Einleitung	6
2.1.1 Das humane Immundefizienz-Virus	7
2.1.2 Therapie der HIV-Infektion	9
2.1.3 Die HIV-1 Protease	10
2.2 Material und Methoden	23
2.2.1 Verwendete Materialien	23
2.2.2 Verwendete Medien und Puffer	23
2.2.2 Expression und Aufreinigung der HIV-1 Protease	25
2.2.2 Enzymassay	30
2.2.3 Kristallisation der HIV-1 Protease	33
2.2.4 Röntgenstrukturanalyse und Strukturverfeinerung	35
2.3 Ergebnisse und Diskussion	37
2.3.1 Multiple Bindungsmodi Pyrrolidin-basierter Inhibitoren der HIV-1 Protease	37
2.3.2 Symmetrieaspekte der Bindung eines Oligoamin-Inhibitors an die HIV-1 Protease	51
2.3.3 Kationische C ₆₀ -Fullerene als Inhibitoren der HIV-1 Protease	64
2.3.4 Piperidin-Derivate als Inhibitoren der HIV-1 Protease	69
2.3.5 Dreiarmlige Pyrrolidine als Inhibitoren der HIV-1 Protease	75
2.3.6 Bicyklische Pyrrolidine als Inhibitoren der HIV-1 Protease	94
2.3.7 Verwendung von Fragmenten im strukturbasierten Design von Inhibitoren der HIV-1 Protease	105
3 Transglutaminase 2	119
3.1 Einleitung	119
3.1.1 Zöliakie	119
3.1.2 Die Transglutaminase 2	120
3.2 Material und Methoden	128
3.2.1 Verwendete Materialien	128
3.2.2 Kristallisation der Transglutaminase 2	128
3.2.3 <i>Screening</i> von Kristallisationsbedingungen	129
3.2.4 Röntgenstrukturanalyse und Strukturverfeinerung	130
3.3 Ergebnisse und Diskussion	132

4	Faktor XIII	163
4.1	Einleitung	163
4.1.1	Antikoagulantien.....	163
4.1.2	Der Faktor XIII	164
4.2	Material und Methoden.....	170
4.2.1	Verwendete Materialien.....	170
4.2.2	Kristallisation des Faktor XIII	170
4.2.3	<i>Screening</i> von Kristallisationsbedingungen	171
4.2.4	Röntgenstrukturanalyse und Strukturverfeinerung.....	171
4.3	Ergebnisse und Diskussion	173
5	Zusammenfassung.....	183
	Literaturverzeichnis.....	187
	Publikationen.....	197
	Danksagung	198
	Eidesstattliche Erklärung	199
	Lebenslauf	200

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångstrom
AIDS	engl. aquired immunodeficiency syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
BSA	Bovines Serumalbumin
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DTD	Dithiandiol
DTT	Dithiothreitol
E.C.	engl. enzyme classification
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPLC	engl. fast protein liquid chromatography
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIV	engl. human immunodeficiency virus
HIV-1 PR	HIV-1 Protease
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k. I.	keine Inhibition
LB	engl. lysogeny broth
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	(3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)
mRNA	engl. messenger RNA
NMR	engl. nuclear magnetic resonance
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
RMSD	engl. root mean square deviation
RNA	engl. ribonucleic acid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLS	Swiss Light Source
TfB	engl. transformation buffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TYM	engl. trypticase yeast extract maltose
rpm	engl. rounds per minute

1 Allgemeine Einleitung und Problemstellung

Im Rahmen des strukturbasierten Designs von Wirkstoffen ermöglicht es die Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie, die Wechselwirkungen von Liganden zum Protein zu studieren. Die erhaltenen Informationen über den Bindungsmodus des Liganden können für das Design neuer Moleküle und die Optimierung der Bindungseigenschaften, zum Beispiel der Affinität zum Protein, genutzt werden. [1]

Bis zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Protein-Ligand-Komplexes ist jedoch oftmals ein langer Weg mit vielen Herausforderungen zu beschreiten. Zunächst muss das Zielprotein rekombinant hergestellt werden, und zwar möglichst rein und in einer für die Kristallisation ausreichenden Menge. Sind noch keine Kristallisationsbedingungen für das Protein beschrieben worden, werden eine Vielzahl von Bedingungen unter Variation verschiedener Parameter getestet, wie zum Beispiel der Temperatur, der Proteinkonzentration und der Anwesenheit von Ionen, Redoxagentien und Liganden. Kristallisationsroboter machen es heutzutage möglich, in kürzester Zeit einen hohen Durchsatz an Kristallisationsbedingungen zu testen. Dennoch kann ein solches *Screening* sehr zeit- und arbeitsintensiv sein, wie auch in dieser Arbeit beschrieben wird.

Auch wenn bereits Kristallisationsbedingungen für das Zielprotein beschrieben wurden, sind diese nicht zwangsläufig auf den gewünschten Protein-Ligand-Komplex übertragbar. Ändert das Protein zum Beispiel durch Bindung des Liganden seine Konformation, können aufgrund veränderter Oberflächeneigenschaften andere Kristallisationsbedingungen erforderlich sein.

Hauptsächlich werden heute zwei verschiedene Methoden zur Kristallisation von Proteinen im Komplex mit Liganden verwendet: Die Co-Kristallisation und das so genannte *Soaking*. Bei der Co-Kristallisation werden Protein und Ligand vor dem Ansetzen miteinander vermischt, so dass eine Bindung im gelösten Zustand erfolgen kann, und beide werden gemeinsam zur Kristallisation angesetzt. Beim so genannten *Soaking* wird das Protein zunächst in Abwesenheit des Liganden kristallisiert. Der Ligand wird anschließend im Überschuss zu den Kristallen gegeben und kann durch die Lösungsmittelkanäle im Protein in die Bindetasche gelangen. Welche Methode im Einzelfall zum Erfolg führt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Kristalle eines Komplexes der HIV-1 Protease mit einem Liganden in der Bindetasche konnten bisher ausschließlich mittels Co-Kristallisation erhalten werden. Durch die Bindung des Liganden werden nämlich fle-

xible Bereiche der Bindetasche, die so genannten Flaps, stabilisiert. In dieser stabilen Konformation ist dann eine erfolgreiche Kristallisation möglich. Geht das Protein unter Bindung von Liganden keine signifikante Konformationsänderung ein, kann bei hinreichender Affinität des Liganden auch das *Soaking* erfolgreich funktionieren. Je kleiner dabei das Molekül, desto besser kann es durch die Lösungsmittelkanäle im Protein diffundieren. [2] In dieser Arbeit wird nachfolgend beschrieben, wie ein Fragment mittels *Soaking* in die Bindetasche gelangen und sein Bindungsmodus mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte.

Wenn schließlich Proteinkristalle vorhanden sind, müssen diese meist im Hinblick auf ihre Form und Größe optimiert werden, bevor sie zur Röntgenstrukturanalyse eingesetzt werden können. Dort werden die Röntgenstrahlen durch die Elektronen der Atome im Kristall gebeugt und anschließend detektiert. Das resultierende Beugungsmuster wird verwendet, um eine Elektronendichtekarte der Moleküle im Kristall zu berechnen. In diese werden die Aminosäuren des kristallisierten Proteins, Wassermoleküle und gegebenenfalls Liganden eingepasst. Das erhaltene Modell der Proteinstruktur wird mittels Energieminimierung verfeinert und im Anschluss erfolgt wiederum eine manuelle Anpassung des Modells. Diese Prozesse werden wiederholt, bis keine weitere Verbesserung des Modells erfolgt.

Je besser das Diffraktionsvermögen eines Kristalls, desto höher ist die Auflösung der resultierenden Kristallstruktur. Die Mehrzahl der bisher aufgeklärten Kristallstrukturen ist von mittlerer bis hoher Auflösung ($\sim 2.8 - 1.5 \text{ \AA}$). Doch auch die Anzahl an Strukturen in der Proteindatenbank mit atomarer Auflösung ($> 1.0 \text{ \AA}$) wächst stetig an. Mit steigender Auflösung sinkt der Fehler der Atomkoordinaten, die Präzision der Kristallstruktur steigt und auch der Bindungsmodus eines Liganden kann genauer und detaillierter beschrieben werden. Heutzutage steht intensive Synchrotronstrahlung zur Verfügung, um Daten mit der höchstmöglichen Auflösung zu sammeln.

Verschiedene Parameter dienen letztendlich zur Beurteilung der Qualität einer Kristallstruktur. Diese müssen von dem Kristallographen bei der Arbeit an einer Kristallstruktur aufmerksam beobachtet werden. Zum Beispiel beschreibt der R-Faktor, wie gut das erhaltene Modell des Proteins mit den experimentellen Daten aus der Röntgenbeugung übereinstimmt und ist somit ein wichtiges Qualitätskriterium für die Aussagekraft einer Kristallstruktur. [3, 4]

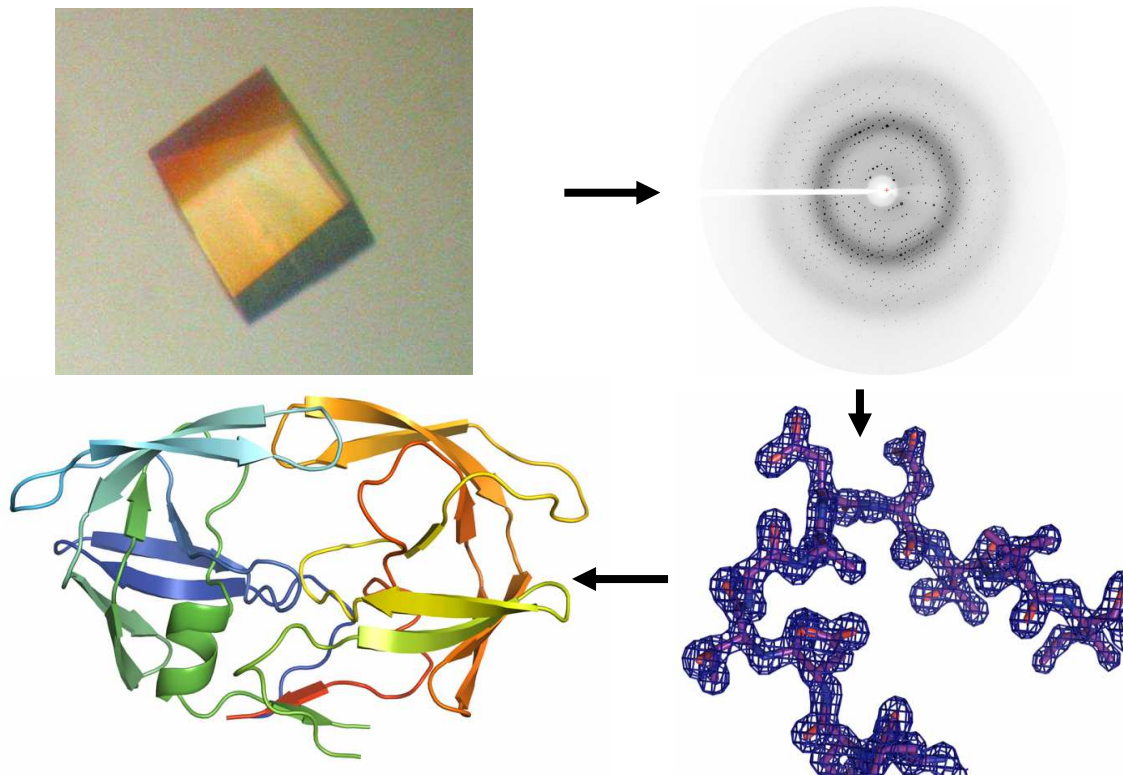


Abbildung 1: Der Weg vom Proteinkristall zur fertigen Kristallstruktur

Röntgenstrahlen werden an einem Proteinkristall gebeugt und anschließend detektiert. Aus dem resultierenden Beugungsmuster, welches oben rechts beispielhaft an einem Diffraktionsbild gezeigt ist, kann eine Elektronendichtekarte errechnet werden (unten rechts). In diese werden die Aminosäuren des Proteins und weitere im Kristall befindliche Moleküle eingepasst. Schlußendlich wird eine dreidimensionale Struktur des kristallisierten Proteins erhalten (unten links, Beispiel: HIV-1 Protease).

Drei verschiedene Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit als Zielstrukturen für das strukturbasierte Wirkstoffdesign verwendet: Die HIV-1 Protease und die humanen Proteine Transglutaminase 2 und der Blutgerinnungsfaktor XIII. Die Unterschiede zwischen den Eigenschaften dieser Proteine, zum Beispiel in ihrer Funktionalität, ihrer Kristallisierbarkeit oder ihrer Etablierung als Zielprotein im Wirkstoffdesign, stellten eine große Herausforderung dar, ermöglichten aber auch die Vielseitigkeit in der Anwendung von Methoden und dieser Arbeit allgemein.

Die HIV-1 Protease ist ein etabliertes Zielprotein im strukturbasierten Wirkstoffdesign. Zahlreiche Kristallstrukturen von Komplexen des Proteins mit verschiedensten Liganden sind bereits in der Proteindatenbank hinterlegt und in Journalen veröffentlicht worden, so dass umfangreiche Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand zur Verfügung stehen. Dennoch bleibt es schwierig, den Bindungsmodus eines bestimmten Liganden vorherzusagen, da die Bindetasche eine hohe Flexibilität besitzt. Der symmetrische Charakter des homodimeren Proteins stellt weiterhin eine besondere Herausforderung für das Design von Liganden dar, wie auch in dieser Arbeit

beschrieben wird. Damit die Kristallisation der HIV-1 Protease im Komplex mit einem Liganden gelingt, muss dieser einige Voraussetzungen erfüllen, wie zum Beispiel eine hinreichende Affinität zum Protein, eine ausreichende Löslichkeit und eine Möglichkeit zur Wechselwirkung mit der Flap-Region.

Die Transglutaminase 2 und der Faktor XIII haben bisher nur selten Verwendung als Zielproteine für das strukturbasierte Wirkstoffdesign gefunden. Beide Proteine bestehen aus mehreren Domänen, die ihre relative Lage zueinander verändern müssen, um ein Substrat oder einen Inhibitor zu binden. Um Informationen über die Bindetasche der Proteine in der so genannten aktiven Konformation zu erhalten, müssen diese im Komplex mit einem Inhibitor kristallisiert werden. Die Kristallisation der Proteine in dieser Konformation stellt eine große Herausforderung dar, vermutlich muss der Inhibitor einen hohen stabilisierenden Effekt aufweisen. Im Falle der Transglutaminase 2 scheiterten daran bereits verschiedene Forschergruppen [5], bis im Jahr 2007 schließlich die erste Kristallstruktur eines Komplexes veröffentlicht wurde [6]. Der Faktor XIII konnte bisher nicht im Komplex mit einem Inhibitor in der aktiven Konformation kristallisiert werden, so dass keine experimentellen Daten über die Ausgestaltung der Bindetasche vorliegen.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die beschriebenen Proteine im Komplex mit ihren jeweiligen Liganden zu kristallisieren und deren Bindungsmodus mittels Röntgenkristallographie zu bestimmen. Die in den Kristallstrukturen der Komplexe beobachteten Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den Liganden sollten helfen, neue Moleküle mit optimierten Bindungseigenschaften zu entwickeln und damit einen Beitrag zur Entwicklung neuer Arzneistoffe zu leisten.

So unterschiedlich wie der Charakter der Zielproteine sind auch die Indikationen, bei denen die in dieser Arbeit vorgestellten Inhibitoren als potentielle Arzneistoffe eingesetzt werden können. Inhibitoren der HIV-1 Protease werden weltweit zur Therapie von HIV-infizierten Menschen eingesetzt und helfen, die Zeit bis zum Ausbruch der Immunschwäche-Krankheit AIDS zu verlängern sowie deren Symptomatik zu lindern. Patienten, die an Zöliakie erkrankt sind und keine Nahrungsmittel mit Gluten zu sich nehmen können, hilft heutzutage nur eine strikte Diät. Ein Medikament mit einem Inhibitor der Transglutaminase 2 als Wirkstoff könnte ihnen zumindest zeitweise eine normale Ernährung ermöglichen und damit ihre Lebensqualität signifikant erhöhen. Der Blutgerinnungsfaktor XIII wird im Rahmen der antikoagulativen Therapie von den zur

Zeit zugelassenen Arzneistoffen bisher nicht adressiert. Inhibitoren des Proteins stellen eine neue Option in der Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar.

2 HIV-1 Protease

2.1 Einleitung

Die ersten Fälle der erworbenen Immunschwäche-Krankheit AIDS wurden im Jahr 1981 beschrieben. In einer Gruppe homosexueller Männer in den USA wurde eine erhöhte Inzidenz schwerer opportunistischer Infektionen, unter anderem dem Kaposi-Sarkom, beobachtet. Im Jahr 1983 konnte dann erstmals aus dem Lymphknoten eines an AIDS Erkrankten ein bis dahin unbekannter Retrovirus isoliert werden. Dieser wurde als Erreger von AIDS identifiziert und bekam später den Namen humanes Immundefizienz-Virus (HIV). [7, 8]

In den vergangenen drei Jahrzehnten hat sich AIDS zu einer weltweiten Pandemie entwickelt. Nach Schätzungen von UNAIDS lebten im Jahr 2009 33,3 Millionen Menschen weltweit mit HIV, 2,6 Millionen Menschen infizierten sich in diesem Jahr neu mit dem Virus. Insbesondere betroffen sind dabei, wie Abbildung 2 zeigt, die Menschen im subsaharischen Afrika. [9]

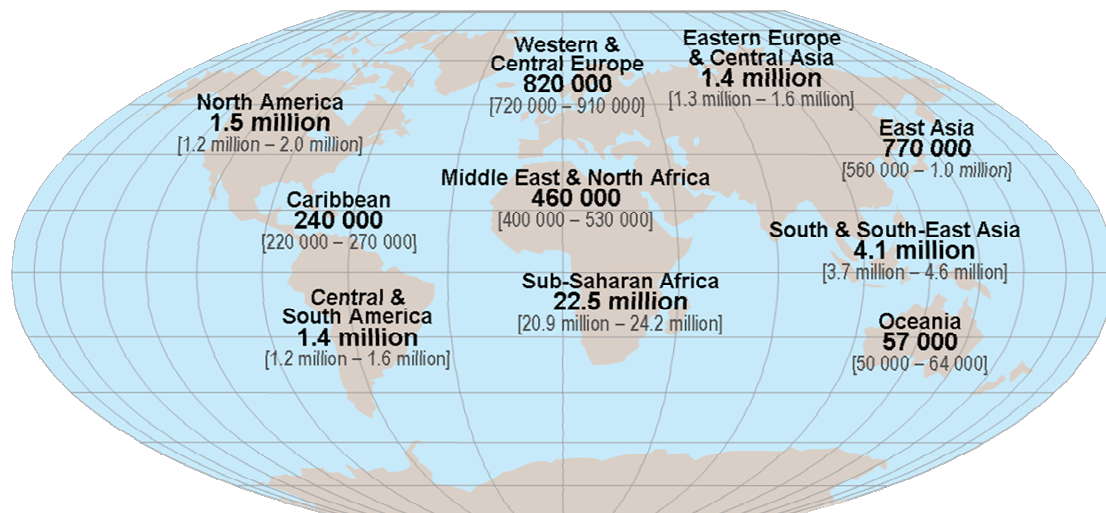


Abbildung 2: Geschätzte Anzahl der HIV-Infektionen weltweit im Jahr 2009 [9]

Zahlreiche Medikamente, deren Wirkstoffe die verschiedensten Mechanismen nutzen, wurden im Kampf gegen AIDS entwickelt. Der Ausbruch der Krankheit kann heute verzögert, ihr tödlicher Verlauf aber nicht verhindert werden. Um so mehr wird weiter intensiv geforscht, um die Therapie gerade im Hinblick auf die zunehmende Resistenz-

bildung des Virus zu verbessern. Ehrgeizige Ziele, wie eine Impfung gegen HIV oder eine vollständige Eliminierung der Viren im Körper, sind jedoch bis heute unerreicht.

2.1.1 Das humane Immundefizienz-Virus

Das humane Immundefizienz-Virus ist ein Vertreter der Retroviren und wird der Gattung der Lentiviren zugeordnet. Die genetische Information von Retroviren wie HIV liegt charakterischerweise in Form von einzelsträngiger RNA vor, die mittels eines Enzyms, der Reversen Transkriptase, in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden kann.

Zwei verschiedene Typen des HIV sind heute bekannt, die wiederum in zahlreiche Subtypen eingeteilt werden: HIV-1 ist weltweit verbreitet und für den Großteil der Infektionen verantwortlich, während HIV-2 hauptsächlich in Westafrika vorkommt.

Abbildung 3 zeigt den Aufbau eines HIV-Partikels. Das konische Kapsid im Inneren des Partikels enthält zwei identische RNA-Moleküle als Virusgenom sowie die drei viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase. Die äußere Hüllmembran ist mit den externen und transmembranen Glycoproteinen gp120 und gp41 assoziiert.

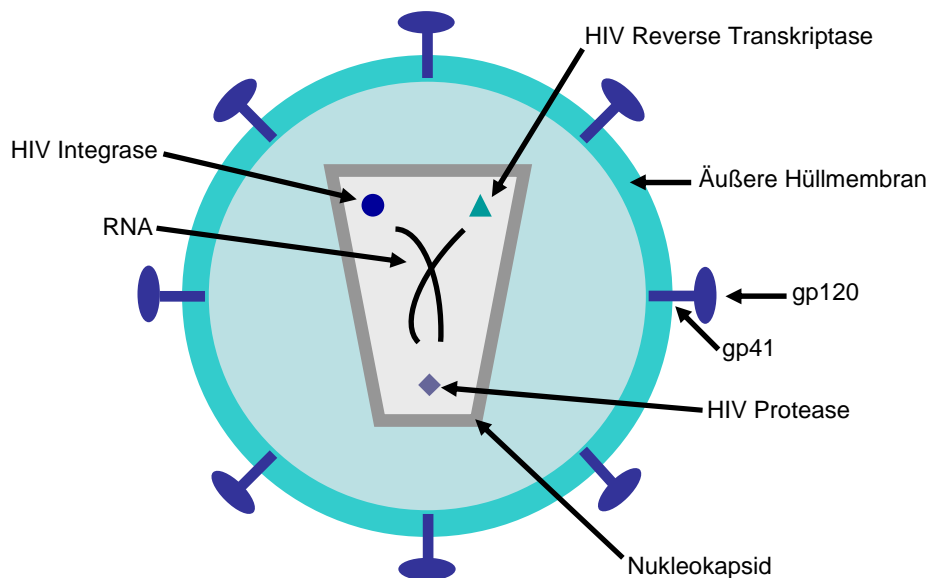


Abbildung 3: Aufbau eines HIV-Partikels

Der erste Schritt in der Replikation des HIV ist die Adsorption der Viruspartikel an humane Zielzellen, meist T-Lymphozyten, die einen CD4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Diese werden auch T-Helferzellen genannt und spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Der Virus bindet über das externe Glykoprotein gp120 an den CD4-

Rezeptor der Wirtszelle, unterstützt wird die Bindung durch verschiedene, als Co-Rezeptoren fungierende Chemokinrezeptoren. Die Virushülle verschmilzt mit der Cytoplasmamembran der Wirtszelle, so dass das Kapsid freigesetzt wird. Im Cytoplasma schreibt die Reverse Transkriptase die einzelsträngige virale RNA in doppelsträngige DNA um. Diese DNA wird im Zellkern, vermittelt durch die virale Integrase, in das Wirtszellgenom eingebaut und fortan transkribiert. Die gebildete mRNA wird ins Cytoplasma exportiert und dort translatiert. Regulatorische Proteine, die die Transkription im Zellkern verstärken, sowie Vorläuferproteine der viralen Strukturproteine und Enzyme werden synthetisiert. Diese Vorläuferproteine lagern sich an der Cytoplasmamembran mit mRNA, die als neues Virusgenom dient, zusammen. Unreife Viruspartikel werden freigesetzt. Die Proteasedomänen der Vorläuferproteine können bei dem vorliegenden, leicht sauren pH-Wert von 6,0 bis 6,2 dimerisieren und sich autokatalytisch abspalten. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt nun durch die Spaltung der Vorläuferproteine durch die HIV-Protease. [8, 10-13]

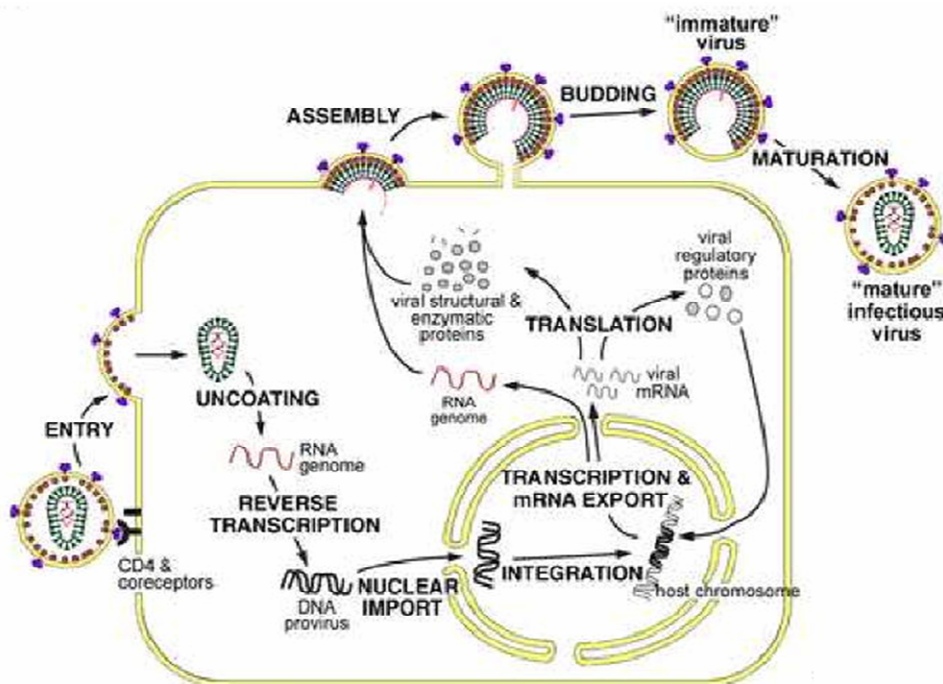


Abbildung 4: Replikationszyklus des HIV [11]

Die hohe Variabilität des Genoms von Retroviren wie HIV ist insbesondere auf die Ungenauigkeit der humanen RNA-Polymerase II zurückzuführen. Diese arbeitet bei der Transkription mit einer verhältnismäßig hohen Fehlerrate beim Einbau der Nukleotide in

die mRNA. Auch die Ungenauigkeit der Reversen Transkriptase trägt zur hohen Mutationsrate der Retroviren bei, wenn auch in geringerem Ausmass. [8]

Charakteristisch für eine Infektion mit Lentiviren ist das relativ langsame Fortschreiten der Erkrankung. Die erste Phase verläuft häufig inapparent oder mit grippeähnlichen Symptomen, die meist nicht einer Infektion mit HIV zugeordnet werden. Anschließend erfolgt ein symptomfreies Latenzstadium, das mehrere Jahre andauern kann. In der dritten Phase der Infektion sinkt die Anzahl von CD4-Helferzellen ab und das Immunsystem ist stark geschwächt. Es treten vermehrt opportunistische Infektionen, Krebserkrankungen und neurologische Erkrankungen auf, die schließlich meist zum Tod der Erkrankten führen. [8, 14, 15]

2.1.2 Therapie der HIV-Infektion

Seit der Identifizierung des HIV als Erreger von AIDS sind enorme Anstrengungen zur Entwicklung geeigneter Therapieoptionen unternommen worden. Im Jahr 1987 wurde in den USA das erste Medikament mit dem Wirkstoff Zidovudin zur Behandlung der HIV-Infektion zugelassen. Zidovudin ist ein nukleosidischer Inhibitor der Reversen Transkriptase. Weitere Arzneimittel mit dem gleichen Wirkmechanismus kamen in den folgenden Jahren auf den Markt. Ein Durchbruch in der Therapie erfolgte nach Zulassung der Proteaseinhibitoren Saquinavir und Indinavir im Jahr 1995 und Nevirapin als nicht-nukleosidischer Inhibitor der Reversen Transkriptase im Jahr 1996. Die Kombination von Arzneimitteln dieser drei Substanzklassen ist bis heute die Basis der so genannten Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). [15, 16]

Die Therapie der HIV-Infektion bedarf kontinuierlicher Weiterentwicklung, insbesondere aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus und darauffolgender Resistenzbildung. Kombinationstherapeutika, neue Arzneimittel der beschriebenen Substanzklassen, aber auch Medikamente mit neuen Wirkmechanismen sind das Resultat der vergangenen Jahre. Der Fusionsinhibitor Enfuvirtide, die Antagonisten des Co-Rezeptors CCR5, Maraviroc und Vicriviroc, und die Inhibitoren der Integrase, Raltegravir und Elvitegravir, stellen neue Therapieoptionen dar. In Deutschland sind heute 22 Arzneimittel aus sechs verschiedenen Substanzklassen zur Therapie der HIV-Infektion zugelassen.[15-17]

Die Diagnose und der Beginn der Therapie der HIV-Infektion sollten möglichst frühzeitig erfolgen. Die Effizienz der Therapie und damit die Lebensdauer des Erkrankten sind umso höher, je früher eine Behandlung der HIV-Infektion erfolgt. Die Lebenserwartung

eines an AIDS Erkrankten ist dann im Vergleich zu nicht infizierten Menschen heute nur geringfügig reduziert. [14]

Mit Hilfe der beschriebenen Therapieansätze kann die Viruslast im Körper reduziert und der Ausbruch von AIDS verzögert werden. Eine Heilung der HIV-Infektion durch vollständiges Entfernen der Viren im Körper ist jedoch heute noch nicht möglich. [18] Ein vielversprechender Ansatz wurde im Jahr 2007 veröffentlicht: Mit Hilfe eines Enzyms, der Rekombinase Tre, gelang es, das HIV-Genom aus infizierten Wirtszellen dauerhaft herauszuschneiden. [19] Bis ein solches Prinzip kurative Anwendung finden kann, sind jedoch noch einige Hürden zu überwinden. Auch intensive Bemühungen, einen Impfstoff gegen HIV zu entwickeln, sind bisher erfolglos geblieben. Insbesondere die Berücksichtigung der hohen genetischen Diversität der Viren stellt dabei eine große Herausforderung dar [20-22].

Von großer Bedeutung ist die Prävention der HIV-Infektion, insbesondere in Entwicklungsländern: Die Aufklärung über Übertragungswege und Schutzmöglichkeiten, die Verteilung von Kondomen, die medikamentöse Prävention der Übertragung von Mutter zu Kind bei der Geburt und das Verteilen von sauberen Nadeln und Spritzen an Drogensüchtige sind wichtige Maßnahmen im Kampf gegen AIDS.[23]

2.1.3 Die HIV-1 Protease

Die HIV-1 Protease – eine Aspartylprotease

Die HIV-1 Protease ist ein Enzym aus der Familie der Aspartylproteasen, deren katalytische Funktion durch zwei Aspartate im aktiven Zentrum ausgeübt wird. Aspartylproteasen spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in den verschiedensten Organismen. Strukturelle Unterschiede bedingen die jeweilige Substratspezifität und damit die Funktion des jeweiligen Enzyms. Aspartylproteasen sind auch häufig Zielproteine in einer Arzneimitteltherapie: Beispielsweise werden Inhibitoren der humanen Aspartylproteasen Renin und β -Sekretase zur Therapie von Bluthochdruck und Morbus Alzheimer eingesetzt. Neben dem Menschen nutzen auch Pflanzen, Bakterien, Pilze und Viren wie HIV die proteolytische Funktion der Aspartylproteasen. [24, 25]

Die Struktur der HIV-1 Protease

Die HIV-1 Protease war das erste Protein des HIV, dessen dreidimensionale Struktur mittels Röntgenkristallographie bestimmt werden konnte. Im Jahr 1989 wurde die erste Kristallstruktur veröffentlicht [26], dies erleichterte fortan die Erforschung der Pathophysiologie des Virus und das Design von Inhibitoren der HIV-1 Protease.

Die HIV-1 Protease ist ein C₂-symmetrisches Homodimer, bestehend aus zwei identischen Proteinuntereinheiten mit jeweils 99 Aminosäuren. Die beiden katalytisch aktiven Aspartate, Asp25A und Asp25B, befinden sich am Grund des ausgedehnten aktiven Zentrums an der Kontaktfläche der beiden Monomere. Jede Untereinheit steuert eines der beiden Aspartate bei, die in einer identischen, für Aspartylproteasen typischen, Tripeptidsequenz Asp-Thr-Gly lokalisiert sind. [27, 28] Zwei flexible β -Faltblattregionen, die sogenannten Flaps, befinden sich oberhalb des aktiven Zentrums und steuern durch Konformationsänderungen den Zugang von Substraten und Inhibitoren zur Bindetasche des Proteins. Im nativen Zustand befindet sich die Flap-Region in einer halb geöffneten Konformation ("semi-open conformation"). Um ein Molekül in die Bindetasche aufzunehmen, werden die Flaps weiter geöffnet ("open conformation") und anschließend durch die Bindung an Substrat oder Inhibitor geschlossen ("closed conformation"). [29] Abbildung 5 zeigt die HIV-1 Protease einmal mit einer offenen Flap-Konformation, die jedoch durch Kristallkontakte stabilisiert wurde, und im Komplex mit einem Inhibitor und somit geschlossener Flap. Die Stabilität der HIV-1 Protease steigt durch die Bindung eines Inhibitors, dessen Einfluss im Bereich der Bindetasche am größten ist, insbesondere durch die Stabilisierung der Flap-Region. [30]



Abbildung 5: Kristallstrukturen der HIV-1 Protease mit geöffneter Flap (links, PDB-Code 1HHP [31]) und geschlossener Flap, stabilisiert durch einen Inhibitor (rechts, PDB-Code 3CKT [32]). Die Flap-Region ist jeweils in pink hervorgehoben.

Der katalytische Mechanismus der HIV-1 Protease

Die HIV-1 Protease katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen; der am häufigsten propagierte Mechanismus dafür ist in Abbildung 6 gezeigt. Voraussetzung dafür ist, dass eines der katalytischen Aspartate protoniert und das andere nicht protoniert vorliegt. Das nicht protonierte, negativ geladene Aspartat polarisiert ein Wassermolekül, während das protonierte Aspartat eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe des Peptidrückgrats des Substrats eingeht. Das nukleophile Wassermolekül greift die polarisierte Carbonylgruppe des Peptids an, ein tetraedrischer Übergangszustand wird gebildet. Die Protonierung des Amidstickstoffs des Peptids resultiert schließlich im Zerfall des Intermediats zu den Produkten der Hydrolyse. [27]

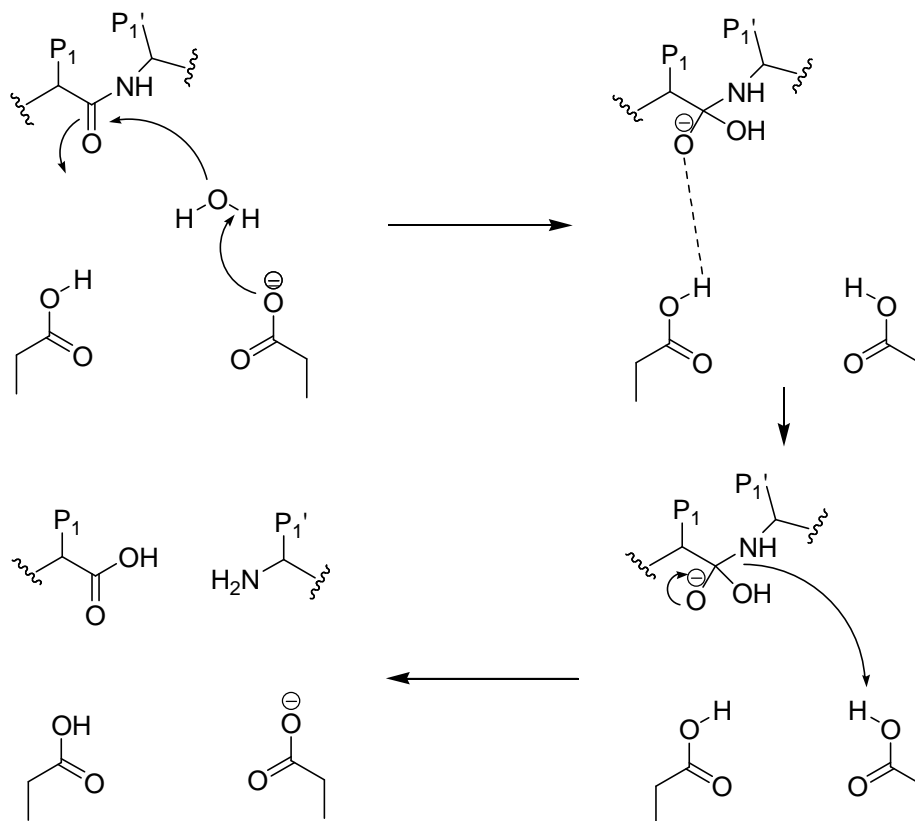


Abbildung 6: Katalytischer Mechanismus der Aspartylproteasen [27]

Die Bindung der Substrate an die HIV-1 Protease

Für die Reifung der Viruspartikel katalysiert die HIV-1 Protease die hydrolytische Spaltung der viralen Vorläuferproteine an neun nicht homologen Stellen. Dabei wird ein Peptidstrang von mindestens acht Aminosäuren des Substrats von der HIV-1 Protease gebunden. Im Gegensatz zur internen Symmetrie des Proteins sind die viralen Substrate asymmetrisch. [33] Die Nomenklatur der Wechselwirkung zwischen Substrat und Pro-

tein wurde von Schechter und Berger beschrieben. Die Bindetasche des Proteins wird dabei in "subsites", abgekürzt mit S, unterteilt; die korrespondierenden Aminosäureseitenketten des Substrats werden mit P bezeichnet. Die Nummerierung geht von der Spaltstelle des Peptids aus. In Richtung des N-Terminus werden die Seitenketten mit P1, P2, P3, ... und in Richtung des C-Terminus mit P1', P2', P3', ... bezeichnet. [34] Die beiden S1-Taschen weisen eine ausgeprägte Hydrophobizität auf, wie auch die benachbarten S3-Taschen. Die S2-Taschen sind ebenfalls vornehmlich hydrophob, mit Ausnahme der Aminosäuren Asp29 und Asp30. [27]

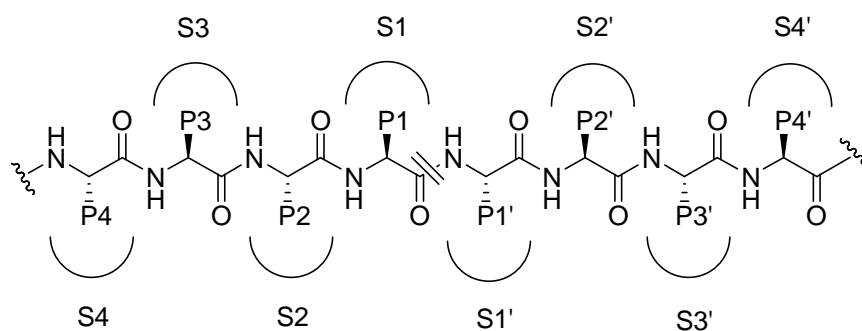


Abbildung 7: Nomenklatur der Seitenketten eines Substrats und der entsprechenden Bindetaschen des Proteins [34]

Eine Kristallstruktur der inaktiven Mutante D25N der HIV-1 Protease im Komplex mit einem Dekapeptid zeigt beispielhaft die Bindung eines Substrats zum Enzym in Abbildung 8. Das von einem der natürlichen Substrate abgeleitete Peptid mit der Sequenz Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Ala-Glu-Ala-Met-Ser ist weder in Bezug auf die Größe der Aminosäuren noch in den elektrostatischen Eigenschaften symmetrisch. Um der Asymmetrie des Substrats gerecht zu werden, wird die Symmetrie der HIV-1 Protease durch die Bindung aufgehoben, wie auch das Interaktionsmuster zeigt. Die Spaltstelle befindet sich zwischen Leucin in Position P1 und Alanin in Position P1'. Die Carbonylgruppe des Rückgrats des Leucins geht eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Seitenkette der Aminosäure Asn25B ein, die eines der katalytischen Aspartate ersetzt. Im Zentrum des Komplexes verknüpft ein Wassermolekül die Aminosäuren Ile50A und Ile50B mit den Carbonylgruppen des Rückgrats der Aminosäuren in Position P2 und P1', ein Muster, welches häufig in Komplexstrukturen der HIV-1 Protease beobachtet werden kann. Das Substrat bildet zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein aus, wie Abbildung 8 zeigt. Diese sind vorwiegend direkter Art, werden aber auch durch Wassermole-

küle vermittelt. Ein Großteil der Wasserstoffbrückenbindungen wird dabei vom Rückgrat des Substrats aus geknüpft und trägt somit nicht zur Spezifität bei. Die einzige direkte Interaktion zwischen einer Seitenkette des Substrats zum Protein wird von einem Glutamat in P2'-Position gebildet und leistet somit alleinig einen Beitrag zur Spezifität der Substraterkennung. Daraus lässt sich schließen, dass die Komplementarität in der Ausformung von Substrat und Bindetasche eine wichtige Rolle in der Substraterkennung spielt. [33]

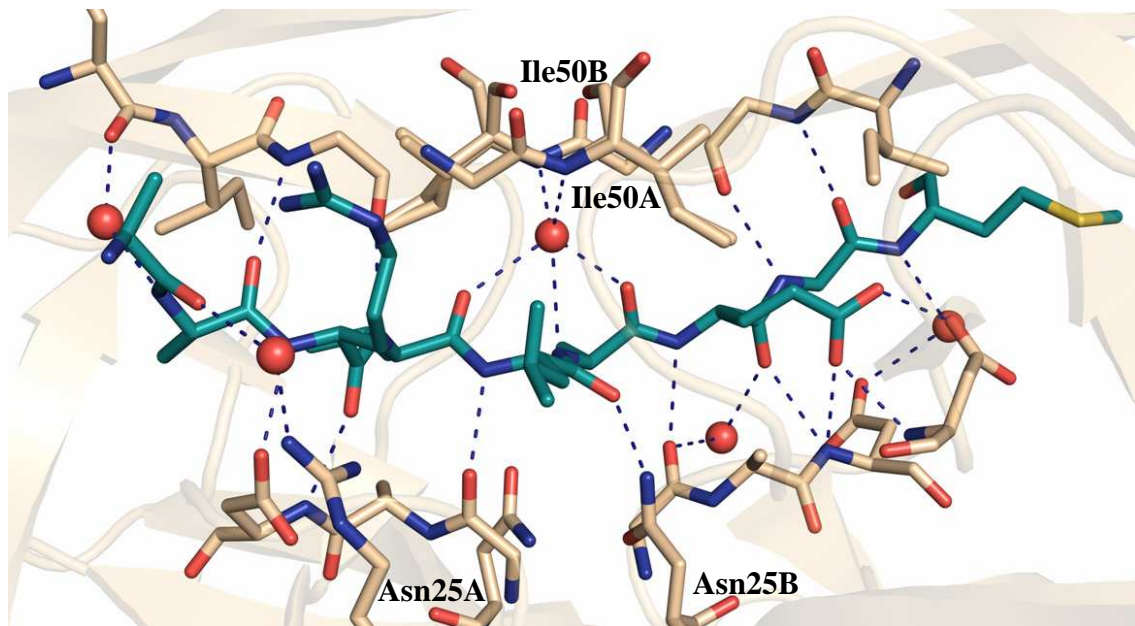
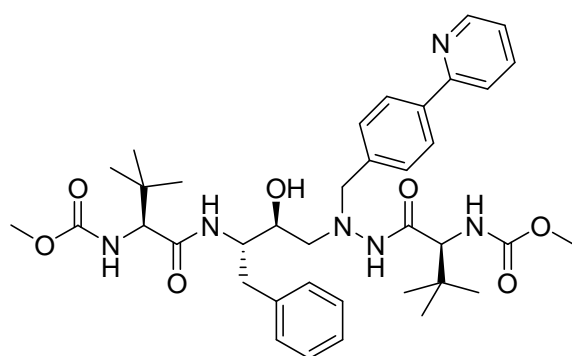


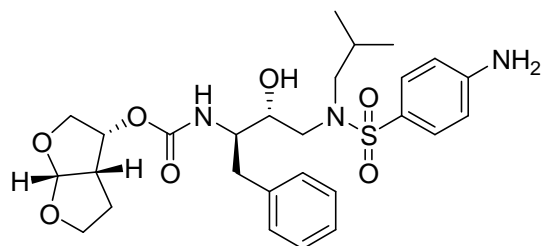
Abbildung 8: Kristallstruktur der HIV-1 Protease Mutante D25N im Komplex mit einem Substrat (PDB-Code 1F7A [33]). Das Substrat ist in türkis, die HIV-1 Protease in beige und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien in blau dargestellt.

Inhibitoren der HIV-1 Protease

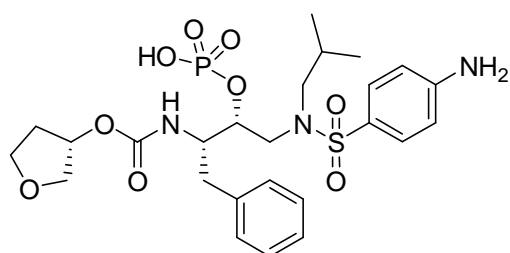
Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der HIV-1 Protease machte das gezielte Design von Inhibitoren des Proteins möglich. Im Jahr 1995 wurde der Wirkstoff Saquinavir als erster Inhibitor der HIV-1 Protease zugelassen. Heute sind neun verschiedene Proteaseinhibitoren zur Therapie der HIV-Infektion verfügbar. Der Wirkstoff Ritonavir wird meist in Kombination mit anderen Proteaseinhibitoren verschrieben, da er durch die Inhibition des Cytochrom-P450-Enzyms CYP3A4 deren Abbau zu unwirksamen Metaboliten verlangsamt.



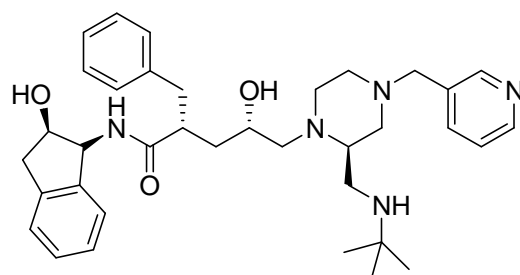
Atazanavir



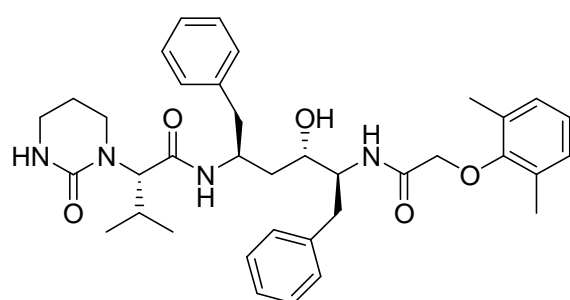
Darunavir



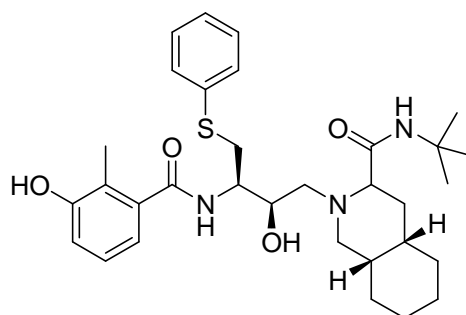
Fosamprenavir (Prodrug)



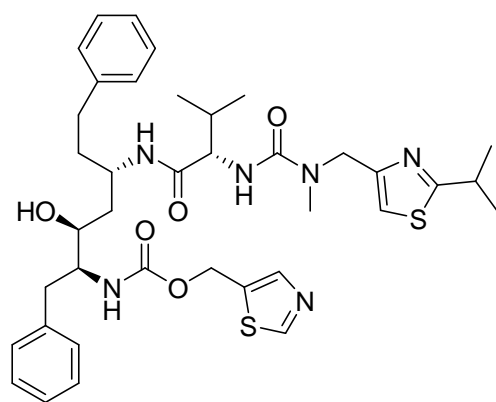
Indinavir



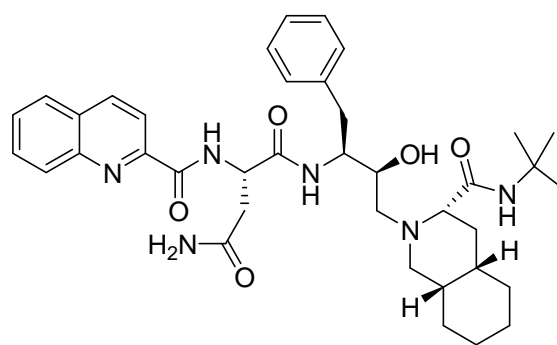
Lopinavir



Nelfinavir



Ritonavir



Saquinavir

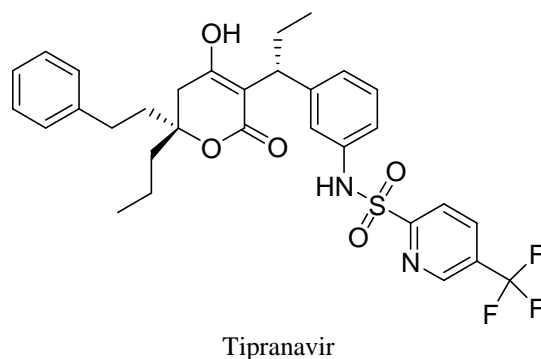


Abbildung 9: Übersicht über die zugelassenen Inhibitoren der HIV-1 Protease

Alle Arzneistoffe, mit Ausnahme von Tipranavir, sind peptidomimetische Inhibitoren mit einer Hydroxylfunktion, die ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen mit den katalytischen Aspartaten bildet. Tipranavir besitzt einen Hydroxypyron-Ring als zentrales Gerüst und interagiert über die Hydroxygruppe mit dem katalytischen Zentrum. Der nicht-peptidomimetische Inhibitor Tipranavir ist im Vergleich zu den anderen Proteaseinhibitoren weniger affin. [35]

Die Entwicklung der Inhibitoren orientierte sich zu Beginn an den Sequenzen der natürlichen Substrate des Proteins und an der Entdeckung, dass der Pepsin-Inhibitor Pepstatin A ebenfalls die HIV-1 Protease inhibiert. Kristallographische und NMR-basierte Strukturaufklärung von Komplexen der HIV-1 Protease mit Inhibitoren stellte damals wie heute einen wichtigen Bestandteil im Designprozess dar und machte es möglich, die initialen Leitstrukturen zu hochaffinen Inhibitoren weiterzuentwickeln. [36, 37] Nachfolgend werden die Strukturen der HIV-1 Protease im Komplex mit den Inhibitoren Saquinavir und Tipranavir im Detail beschrieben. Die Entwicklung von Inhibitoren der HIV-1 Protease soll anhand dieser Meilensteine beispielhaft vorgestellt werden.

Der Ausgangspunkt in der Entwicklung des Inhibitors Saquinavir war die Beobachtung, dass die Spaltung der Substrate der HIV-1 Protease häufig zwischen den Aminosäuren Phenylalanin und Prolin erfolgt. Eine sekundäre Hydroxylfunktion im Inhibitor zwischen den beiden Aminosäuren imitiert hier den Übergangszustand, der bei der Substratspaltung auftritt. Prolin wurde durch einen Dekahydroisochinolin-Ring ersetzt, um die Bindungsaffinität zu steigern. Dieser adressiert die S1'-Tasche des Proteins. In der S1-Tasche werden ebenfalls hydrophobe Wechselwirkungen zu dem Phenylalaninrest und einem Quinolinring ausgebildet, letzterer reicht bis in die S3-Tasche hinein. Trotz des hydrophoben Charakters der S2-Taschen besitzt Saquinavir wie auch viele andere Inhibitoren der HIV-1 Protease in Position P2 einen hydrophilen Substituenten. Der

Asparaginrest des Inhibitors adressiert die S2-Tasche und geht Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Asp29A und Asp30A ein. Ein Wassermolekül vermittelt die Interaktionen zweier Carbonylgruppen des Inhibitors mit der Flap-Region, wie schon im vorher beschriebenen Komplex der HIV-1 Protease mit einem Substrat vergleichbar beobachtet werden konnte. [36-39]

Der Inhibitor Tipranavir wurde ausgehend vom Arzneistoff Phenprocoumon entwickelt, der in einem Hochdurchsatzscreening eine Aktivität gegenüber der HIV-1 Protease zeigte. Durch Optimierung der Seitenketten konnte die Affinität der Ausgangssubstanz erhöht werden. Der Grundbaustein, ein Hydroxypyron-Ring, bindet über eine Hydroxygruppe an die katalytischen Aspartate. Die Carbonylfunktion interagiert hier direkt mit den Amidstickstoffen des Rückgrats der Aminosäuren Ile50A und Ile50B und verdrängt somit das in dieser Position häufig beobachtete Wassermolekül. Die S1- und S2-Tasche werden von hydrophoben Substituenten des Hydroxypyronrings adressiert. Eine Ethylgruppe interagiert mit den Aminosäuren der S1'-Tasche, während in der S2'-Tasche sowohl hydrophobe Interaktionen wie auch Wasserstoffbrückenbindungen von der Sulfonamidgruppe zu den Aminosäuren Asp29A und Asp30A ausgebildet werden. Eine Trifluormethylgruppe ragt bis in die S3'-Tasche hinein. [40]

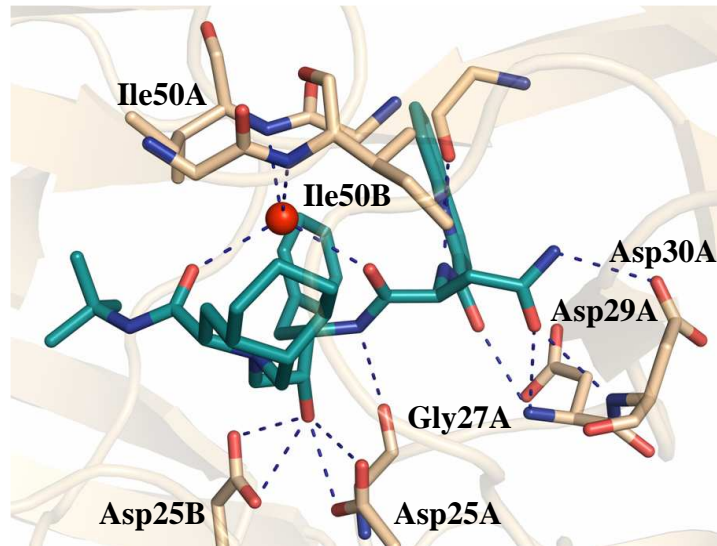


Abbildung 10: Bindungsmodus des Inhibitors Saquinavir (PDB-Code 1HXB [39]). Der Inhibitor ist in türkis, die HIV-1 Protease in beige und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien in blau dargestellt.

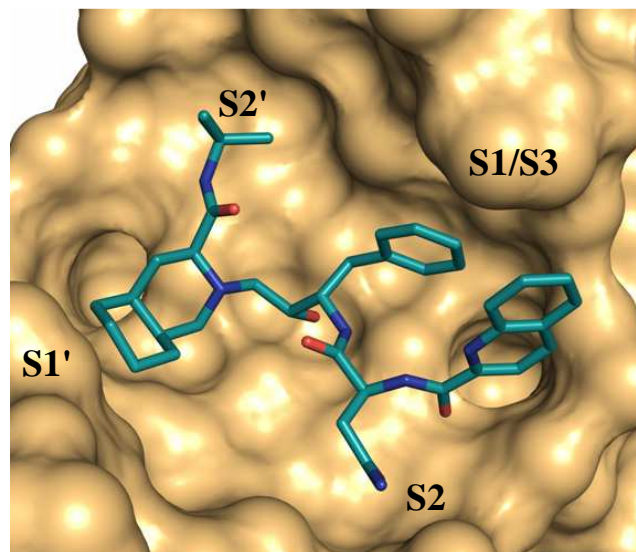


Abbildung 11: Besetzung der Subtaschen der HIV-1 Protease durch den Inhibitor Saquinavir (PDB-Code 1HXB [39]). Der Inhibitor ist in türkis und die HIV-1 Protease in beige dargestellt.

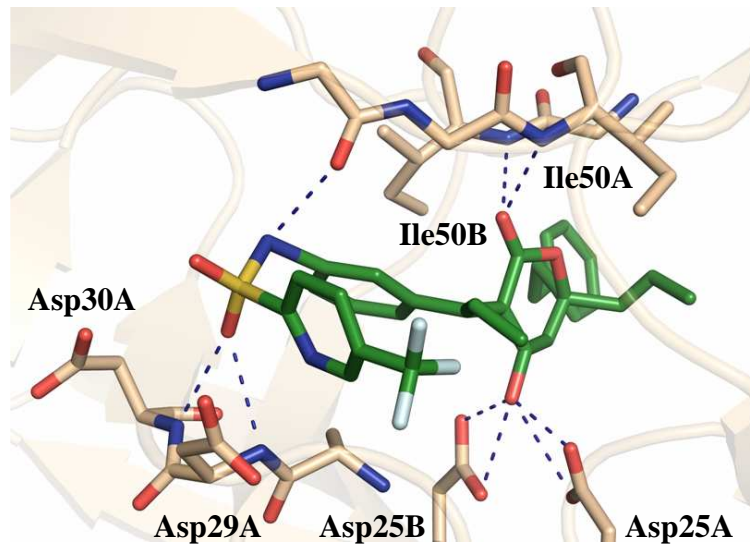


Abbildung 12: Bindungsmodus des Inhibitors Tipranavir (PDB-Code 1D4S [40]). Der Inhibitor ist in grün, die HIV-1 Protease in beige und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien in blau dargestellt.

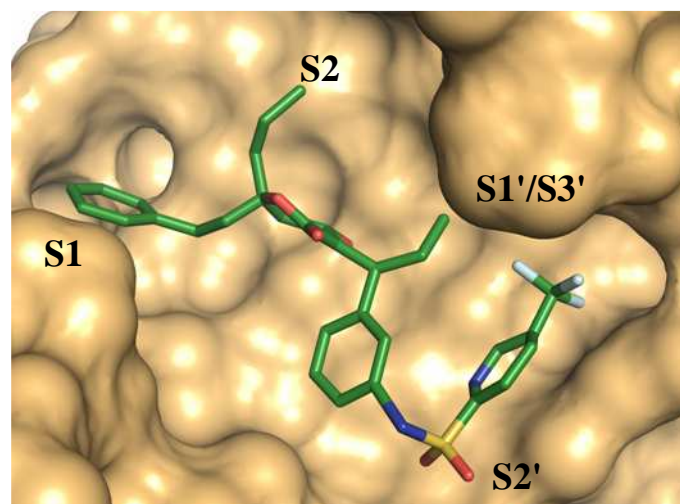


Abbildung 13: Besetzung der Subtaschen der HIV-1 Protease durch den Inhibitor Tipranavir (PDB-Code 1D4S [40]). Der Inhibitor ist in grün, die HIV-1 Protease in beige dargestellt.

Resistenzentwicklung

Durch die hohe Replikationsrate des Virus und der Ungenauigkeit der humanen RNA-Polymerase II sowie der viralen Reversen Transkriptase kommt es zur Entwicklung vieler verschiedener genetischer Varianten des Virus. Die Selektion von resistenten Mutanten führt zur Verringerung der Wirksamkeit der eingesetzten Arzneistoffe. [8, 41] Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren verläuft schrittweise. Gewöhnlich findet zunächst eine primäre Substitution in der Bindetasche der HIV-1 Protease statt, so dass deren Ausformung verändert wird. [35] Die peptidischen Substrate des Enzyms weisen eine vergleichbar hohe Flexibilität auf und können sich besser an solche Konformationsänderungen durch Mutationen in der Bindetasche anpassen. Inhibitoren mit geringerer Flexibilität, die wiederum ihre hohe Spezifität bedingt, können jedoch schon durch geringe Veränderungen in der Bindetasche einen starken Affinitätsverlust erleiden. [42] Später kommen häufig sekundäre Mutationen und auch Insertionen von bis zu sechs Aminosäuren hinzu, die die Resistenz gegenüber den Proteaseinhibitoren weiter verstärken, die Replikation jedoch positiv beeinflussen. Auch in den Substraten der HIV-1 Protease, den viralen Vorläuferproteinen, wurden Mutationen beobachtet, vermutlich zur Adaption an die veränderte Bindetasche. [35]

Mittlerweile sind Resistenzen gegenüber allen zur Zeit zugelassenen Wirkstoffen aufgetreten. Die Entwicklung neuer Proteaseinhibitoren unter Berücksichtigung der aufgetretenen Mutationen und die Adressierung neuer Zielstrukturen wie der Flap-Regionen und der Dimer-Kontaktfläche sind somit von großer Bedeutung für die Therapie in den nächsten Jahrzehnten. Die Strategie einer Verhinderung der Dimerisierung durch Interaktion von Inhibitoren mit der Kontaktfläche scheint sehr vielversprechend. [25] Detaillierte Studien über den energetischen Beitrag der einzelnen Aminosäuren der Kontaktfläche zur Dimerisierung können das Design von Inhibitoren ermöglichen, die an den identifizierten *Hot Spots* angreifen. [43]

Eine Mutante der HIV-1 Protease mit erhöhter Stabilität gegenüber Autoproteolyse

Die HIV-1 Protease ist - als eher unspezifische Protease - gut bekannt dafür, sich autoproteolytisch zu spalten. Dies ist ein häufiges Problem bei experimentellen Arbeiten mit dem Protein, da die Konzentration an aktiv vorliegender HIV-1 Protease in Lösungen über die Zeit durch die autoproteolytische Spaltung abnimmt. Auch im Rahmen dieser Arbeit trat die Schwierigkeit auf, ausreichend Proteinmaterial durch die Expression in *E. coli* und die anschließende Aufreinigung zu gewinnen.

Die Spaltstellen im Protein, an denen die HIV-1 Protease die Autoproteolyse katalysiert, konnten durch die Analyse der Sequenzen der verdauten Proteinbestandteile identifiziert werden. Die primäre Spaltstelle, an der die erste Spaltung erfolgt, befindet sich zwischen den Aminosäuren Leu5 und Trp6 auf einer Schleife, die im dimerisierten Protein intermolekulare Interaktionen zu einer α -Helix des anderen Monomers eingeht. Es ist unklar, ob diese Stelle im korrekt gefalteten Protein für ein anderes Proteasemolekül zugänglich ist. Im monomeren Zustand sind die beschriebenen Interaktionen jedoch nicht vorhanden und die Schleife ist zugänglich für die Proteolyse. Zwei sekundäre Spaltstellen, an denen es erst im Anschluss an die primäre zu einer sekundären autoproteolytischen Spaltung kommt, befinden sich zwischen den Aminosäuren Leu33 und Glu34 sowie Leu63 und Ile64. Diese sekundären Spaltstellen befinden sich auf β -Strängen, die zahlreiche Interaktionen zu weiteren, benachbarten β -Strängen eingehen. Im korrekt gefalteten Protein sind diese Stellen nicht zugänglich, so dass eine zumindest teilweise Entfaltung der Struktur für die Autoproteolyse erforderlich ist. Die physiologische Bedeutung der Autoproteolyse mag eine Inaktivierung nach erfolgter Maturation des Viruspartikels sein, um weitere, ungewollte proteolytische Spaltungen zu verhindern.

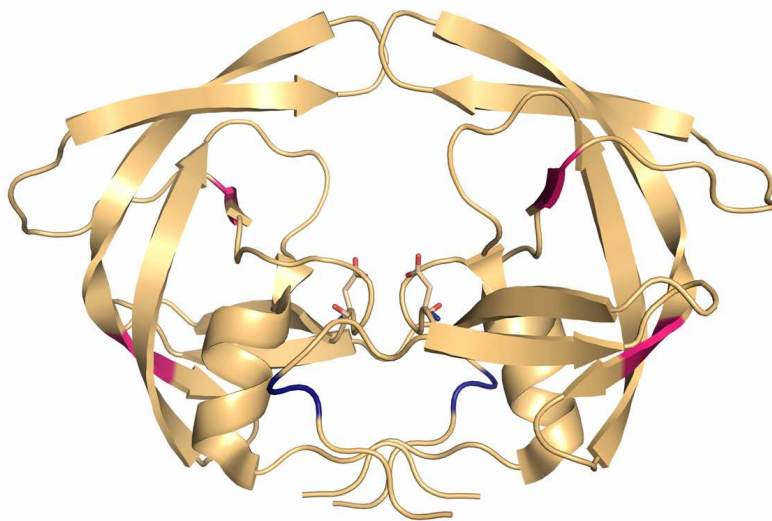


Abbildung 14: Primäre Spaltstelle (blau) und sekundäre Spaltstellen (pink) der Autoproteolyse der HIV-1 Protease

Um die Stabilität der HIV-1 Protease durch Reduzierung der Autoproteolyse zu erhöhen, wurde das Protein an den Spaltstellen verschiedenen Mutationen unterzogen. Eine Untersuchung der natürlichen Substrate der HIV-1 Protease ergab, dass in Position P1

weder Isoleucin noch Valin und in den Positionen P2 bis P2' niemals Lysin vorhanden ist. Verschiedene Mutanten wurden hergestellt, in denen die erwähnten Aminosäuren in ihrer jeweiligen Position an den Spaltstellen eingeführt wurden, und auf ihre Resistenz gegenüber der Autoproteolyse untersucht. Die Mutante Q7K L33I L63I erwies sich dabei als die Mutante mit der höchsten Stabilität gegenüber der Autoproteolyse, die vor allem gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht ist. Sie zeigt aber weiterhin vergleichbare kinetische Eigenschaften und eine vergleichbare Spezifität wie das Wildtyp-Protein. [44, 45]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, das Wildtyp-Protein herzustellen. Doch erst nach der Umstellung auf die Verwendung der Mutante Q7K L33I L63I liess sich das Protein problemlos aufreinigen und konnte erfolgreich für die Kinetik und die Kristallisation eingesetzt werden. Im Text wird jeweils beschrieben, ob das Proteinmaterial des Wildtyps oder der Mutante eingesetzt wurde.

Die HIV-1 Protease als Zielstruktur im Wirkstoffdesign

Viruspartikel, die eine katalytisch inaktive Form der HIV-1 Protease enthalten, sind nicht in der Lage, Wirtszellen zu infizieren. Diese Beobachtung macht die HIV-1 Protease als essentielles Protein des Virus zu einem attraktiven Target für das Wirkstoffdesign. [46] Auch wenn heutzutage bereits viele Wirkstoffe als Proteaseinhibitoren zur Therapie von AIDS und der HIV-Infektion zugelassen sind, ist es insbesondere im Hinblick auf die zunehmende Anzahl von Resistenzen wichtig, immer wieder neue Inhibitoren zu entwickeln. Die Strukturaufklärung von Komplexen der HIV-1 Protease durch Röntgenkristallographie und NMR war und ist eine wichtige Methode für das Design neuer Wirkstoffe. Auch das Wissen über Inhibitoren anderer Aspartylproteasen konnte immer wieder für die Entwicklung neuer HIV-1 Protease - Inhibitoren genutzt werden. So wurden sekundäre Amine als die die katalytischen Aspartate adressierende Funktion initial in Renininhibitoren mit einem Piperidin-Grundgerüst beschrieben. [47-49] Als Grundstruktur von sekundären Aminen als Inhibitoren der HIV-1 Protease wurden in vorangegangenen Studien zunächst fünfgliedrige Pyrrolidinringe und offenkettige Amine beschrieben. [50] Diese werden auch in dieser Arbeit in Kristallstrukturen im Komplex mit der HIV-1 Protease gezeigt. Eine Weiterentwicklung stellen die bizyklischen Pyrrolidininhibitoren dar, die auch als Grundlage für ein fragment-basiertes Design dienen konnten. Verschiedene Moleküle mit einem Piperidin-Grundgerüst und drei Fulleren-Derivate konnten ebenfalls als Inhibitoren der HIV-1 Protease identifiziert werden.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Verwendete Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Fluka und Merck erworben. Die Expressionsplasmide pET-11a und pET-24a(+), die originalen Zellen des kompetenten *E. coli*-Stamms BL21(DE3) und das Enzym Benzonase[®] Nuclease wurden von der Firma Novagen hergestellt. Das Expressionsplasmid pET-24a(+) mit der Sequenz für die Mutante Q7K L33I L63I wurde von Herrn Prof. Ernesto Freire, Universität Baltimore, USA, zur Verfügung gestellt. Das Säulenmaterial Sulfopropyl-(SP-)Sephadex wurde von GE Healthcare erworben. Das Substrat für den Enzymassay wurde bei der Firma Bachem bestellt (Nr. H-2992).

Ein Großteil der für den Enzymassay und die Co-Kristallisation verwendeten HIV-1 Protease Inhibitoren wurden von Nina Klee, Kerstin Linde und Stefanie Dörr aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Diederich am Institut für Pharmazeutische Chemie an der Philipps-Universität Marburg synthetisiert. Die Fulleren-Inhibitoren wurden von Frau Dr. Tatiana Da Ros, Universität Trieste, Italien, zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Verwendete Medien und Puffer

Im folgenden werden die für diese Arbeit verwendeten Medien und Puffer beschrieben. Als Lösungsmittel wurde, sofern nicht anders beschrieben, mittels Ionenaustausch demineralisiertes Wasser verwendet.

Medien

Die zur Kultivierung von *E. coli* verwendeten Medien setzten sich wie in Tabelle 1 beschrieben zusammen. Vor ihrer Verwendung wurden die Medien in einem Autoklaven der Firma Fedegari Autoclavi sterilisiert. Zur selektiven Kultivierung der gewünschten *E. coli*-Zellen wurde den Medien je nach Art des verwendeten Expressionsplasmids ein entsprechendes Antibiotikum hinzugefügt. Das Plasmid pET-11a trägt ein Gen zur Ausbildung einer Ampicillinresistenz; zur Selektion mit diesem Plasmid transformierter Zellen wurde den Medien Ampicillin zu einer finalen Konzentration von 100 µg/ml

hinzugefügt. Im Fall einer Verwendung von pET-24a(+), welches eine Kanamycinresistenz ausbildet, wurde Kanamycin zu einer Endkonzentration von 30 µg/ml hinzugefügt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1% (w/v) Pepton aus Casein 1% (w/v) Natriumchlorid 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
LB-Agar	1% (w/v) Pepton aus Casein 1% (w/v) Natriumchlorid 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1,5% (w/v) Agar-Agar
TYM-Medium	2% (w/v) Pepton aus Casein 100 mM Natriumchlorid 0,5% Hefeextrakt (w/v) 10 mM Magnesiumchlorid

Tabelle 1: Zusammensetzung der Medien

Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen, die für die Herstellung des Proteins, den Enzymassay und die Kristallisation verwendet wurden, wird in Tabelle 2 beschrieben. Die DTT enthaltenden Puffer wurden erst am Tag des Gebrauchs hergestellt und vor ihrer Verwendung bei 8°C gelagert. Die Säulenpuffer wurden vor Gebrauch mit einem Filter mit einem Ausschlussvolumen von 0,22 µm steril filtriert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tfb I-Lösung	2,9% (w/v) Essigsäure 50 mM Manganchlorid 100 mM Kaliumchlorid 10 mM Calciumchlorid 15% (v/v) Glycerol pH 5,8
Tfb II-Lösung	10 mM Kaliumchlorid 10 mM NatriumMOPS 75 mM Calciumchlorid 15% (v/v) Glycerol pH 7,0
<i>Inclusionbody</i> -Puffer 1	100 mM Tris 1 mM Titriplex III pH 7,0

<i>Inclusionbody</i> -Puffer 2	60 mM Titriplex III 4% (v/v) Triton 1,5 M Natriumchlorid pH 7,0
<i>Inclusionbody</i> -Puffer 3	100 mM Tris 20 mM Titriplex III pH 7,0
Solubilisierungspuffer	10 mM Tris 10 mM Natriumchlorid 50 mM DTT 6 M Guanidiniumchlorid pH 8,0
Renaturierungspuffer	1M Harnstoff 10 mM MES 10 mM DTT pH 6,5
Säulenpuffer 1 = Niedrigsalzpuffer	50 mM MES 1 mM Titriplex III 1 mM DTT pH 6,5
Säulenpuffer 2 = Hochsalzpuffer	50 mM MES 1 mM Titriplex III 1 mM DTT 1 M Natriumchlorid pH 6,5
Assaypuffer	100 mM MES 300 mM Kaliumchlorid 5 mM Titriplex III pH 5,5
Kristallisationspuffer (Wildtyp)	50 mM Natriumacetat 1 mM Titriplex III 1 mM DTT pH 5,8
Kristallisationspuffer (Mutante Q7K L33I L63I)	1 mM Natriumacetat 2 mM Natriumchlorid pH 5,0

Tabelle 2: Zusammensetzung der Puffer

2.2.2 Expression und Aufreinigung der HIV-1 Protease

Vermehrung von kompetenten *E. coli*-Zellen

In dieser Arbeit wurden kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms BL21(DE3) verwendet. Um diese zum weiteren Gebrauch zu vermehren, wurden 50 µl der originalen kompetenten Zellen in 5 ml TYM-Medium überführt und über eine Zeitspanne von 2 h bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurde der Ansatz zu

100 ml LB-Medium hinzugegeben und bei gleichen Parametern weiterhin kultiviert, bis eine optische Dichte von mindestens 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 2500 rpm für 5 min geerntet und anschließend in 20 ml Tfb I-Lösung resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 1 h. Nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Parametern wurde das erhaltene Pellet in 4 ml Tfb II-Lösung resuspendiert. Beide Lösungen enthalten Calciumchlorid, durch das die Zellen ihre Kompetenz zur Aufnahme der Plasmid-DNA erhielten. Der Ansatz wurde à 50 µl aliquotiert und zunächst über Nacht bei -20°C, ab dem darauf folgenden Tag dann bei -80°C gelagert.[51]

Plasmid-Mini-Präparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Glycerol-Stocks wurde eine Plasmid-Mini-Präparation mit Hilfe des Kits PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit II der PEQLAB Biotechnologie GmbH analog zum Protokoll durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst alkalisch lysiert. Das Lysat wurde anschließend neutralisiert und die DNA durch Zentrifugation von den präzipitierten Zellbestandteilen abgetrennt. Mit dem erhaltenen Überstand wurde eine DNA-bindende Säule beladen. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA mit demineralisiertem Wasser eluiert. Die Konzentration der erhaltenen Lösung wurde durch Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Plasmid-Lösung wurde anschließend bei -20°C gelagert.

Transformation

Als Expressionsvektoren wurden das Plasmid pET-11a mit einer für den HIV-1 Protease-Wildtyp codierenden DNA-Sequenz sowie das Plasmid pET-24a(+) mit der Sequenz für die Mutante Q7K L33I L63I verwendet. Zur Transformation wurden 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms BL21(DE3) mit 5 µl Plasmid-Lösung versetzt. Durch einen kurzen Hitzeschock für 50 s bei 42°C wurde die Durchlässigkeit der Zellmembran für die DNA erhöht. Nach Lagerung auf Eis für 10 min wurde 1 ml LB-Medium zu dem Ansatz hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wurden 900 µl des Überstands entfernt. Der Rückstand wurde im verbleibenden LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Dem LB-Agar wurde zuvor das entsprechende Antibiotikum zur Selektion der gewünschten Zellen hinzugefügt. Die Agarplatte wurde nach dem Ausplattieren bei 37°C im Brutschrank für ca. 16 h aufbewahrt. Anschließend wurde die

Platte bis zu ihrem Gebrauch im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Für das Animpfen der Vorkultur für die Proteinexpression wurden jeweils frisch transformierte Zellen verwendet.

Proteinexpression

Zur Kultivierung der *E. coli*-Zellen in einer Vorkultur wurde 100 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie frisch transformierter Zellen angeimpft. Das Zellwachstum in der Vorkultur verlief über Nacht für ca. 14 h bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator. Für die Hauptkultur wurden vier mal 1 l LB-Medium mit jeweils 25 ml der Vorkultur versetzt. Die für Vor- und Hauptkultur verwendeten LB-Medien enthielten das jeweils zur Selektion notwendige Antibiotikum. Das Zellwachstum in der Hauptkultur wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei der Vorkultur fortgesetzt, bis eine optische Dichte von 0,8 bis 1 erreicht wurde. Anschließend wurde der Hauptkultur IPTG zu einer finalen Konzentration von 1 mM hinzugefügt, um die Überexpression der HIV-1 Protease zu starten. Nach 2 h wurden dann die Zellen durch Zentrifugation bei 4°C und 6500 rpm für 15 min geerntet. Die Zellpellets wurden über Nacht bei -80°C gelagert.

Aufreinigung der *Inclusion bodies*

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 80 ml *Inclusionbody*-Puffer 1 mit einer Pipette resuspendiert. Der Ansatz wurde danach und auch bei den folgenden Arbeitsschritten immer auf Eis gelagert. Anschließend wurden 1,5 mg Lysozym pro 1 g Zellen hinzugefügt, um die Bakterienzellwände enzymatisch abzubauen, und der Ansatz für 30 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Der Ansatz wurde in zwei Teile geteilt und die verbliebenen Zellbestandteile im Wechsel jeweils fünf mal für 1,5 min mittels Ultraschallwellen aufgeschlossen. Zum Abbau der bakteriellen DNA und zur Reduzierung der Viskosität des Zelllysats wurden 12 µl des Enzyms Benzonase® Nuclease 25000 Units und 25 mg Magnesiumchlorid zu dem vereinigten Ansatz hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 80 ml *Inclusionbody*-Puffer 2 wurde der Ansatz für 30 min geschwenkt, anschließend in zwei Teile geteilt und bei 4°C und 20000 rpm für 30 min zentrifugiert. Für die weiteren Schritte wurde der erhaltene Rückstand verwendet, da die HIV-1 Protease nach Überexpression überwiegend nicht korrekt gefaltet werden kann und in unlöslichen Aggregaten, den sog. *Inclusion bodies*, vorliegt.

Die erhaltenen Pellets wurden in vier aufeinander folgenden Schritten gewaschen und jeweils im Anschluß unter Verwendung der zuvor beschriebenen Parameter zentrifu-

giert. Im ersten Schritt wurden die Pellets mit jeweils 30 ml einer Mischung aus 50% *Inclusionbody*-Puffer 2 und 50% *Inclusionbody*-Puffer 3 resuspendiert. Im zweiten Schritt wurden gleiche Volumina eines Gemisch aus 25% *Inclusionbody*-Puffer 2 und 75% *Inclusionbody*-Puffer 3 verwendet. Es erwies sich als wichtig, die Puffer vor der Zugabe zum Pellet miteinander zu mischen. Im dritten Schritt wurde jedes Pellet in 30 ml *Inclusionbody*-Puffer 3 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die beiden Pellets vereinigt und noch einmal mit 30 ml *Inclusionbody*-Puffer 3 gewaschen. Das nun erhaltene Pellet aus *Inclusion bodies* wurde in 80 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert, der hohe Gehalt an Guanidiniumchlorid sollte hierbei zur Entfaltung der HIV-1 Protease führen. Der Ansatz wurde bei 5°C im Kühlraum über Nacht langsam gerührt.

Renaturierung des Proteins

Im Anschluss wurde die Probe bei 4°C und 20000 rpm für 30 min zentrifugiert, um die nicht gelösten Bestandteile abzutrennen. Der erhaltene Überstand wurde in vier Teile geteilt. Für die weiteren Schritte wurde ein Teil der Probe verwendet, die weiteren drei Teile wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. Die Probe wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussrate von 0,1 ml/min in 2 l Renaturierungspuffer getropft. Dabei mussten entweder Probe und Renaturierungspuffer auf Eis gelagert oder der Prozess im Kühlraum bei einer Temperatur von 5°C durchgeführt werden. Der Renaturierungspuffer, in den die Probe hineingetropft wurde, wurde währenddessen gerührt. Die Entfernung des Denaturierungsmittels von der Proteinoberfläche bei der Verdünnung sollte eine korrekte Faltung des Proteins ermöglichen. War die erhaltene Probe nicht vollständig klar, wurde sie bei 4°C und 6500 rpm für 1 h zentrifugiert und der Rückstand verworfen.

Säulenchromatographische Aufreinigung

Anschließend wurde die Probe mittels einer Kationenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt. Der theoretische isoelektrische Punkt der HIV-1 Protease konnte mit Hilfe des Programms protparam [52] zu 8,83 für das Wildtypprotein und zu 9,14 für die Mutante Q7K L33I L63I berechnet werden. Somit lag das Protein bei einem pH-Wert von 6,5, auf den die Säulenpuffer eingestellt wurden, als Kation vor. Es wurde eine Sulfopropyl-Sepharose-Säule mit einem Volumen von 20 ml verwendet. Diese wurde zu Beginn mit Säulenpuffer 1 äquilibriert. Die Probe wurde mit Hilfe einer mechanischen

Pumpe über Nacht im Kühlraum mit einer Flussrate von 1 bis 2 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule an eine FPLC-Anlage mit einem UV-Detektor angeschlossen und mit Säulenpuffer 1 gespült, bis die UV-Absorption auf einen konstanten Wert gesunken war. Um das Protein zu eluieren, wurde ein linearer Gradient für das Konzentrationsverhältnis von Säulenpuffer 1 zu Säulenpuffer 2 verwendet. Innerhalb von 70 min wurde dabei die Konzentration von Säulenpuffer 2 von 0% auf 70% erhöht und das an die Säule gebundene Protein durch die Erhöhung der Salzkonzentration verdrängt. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen. Die durch UV-Detektion ermittelten, das Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und bei -80°C gelagert.

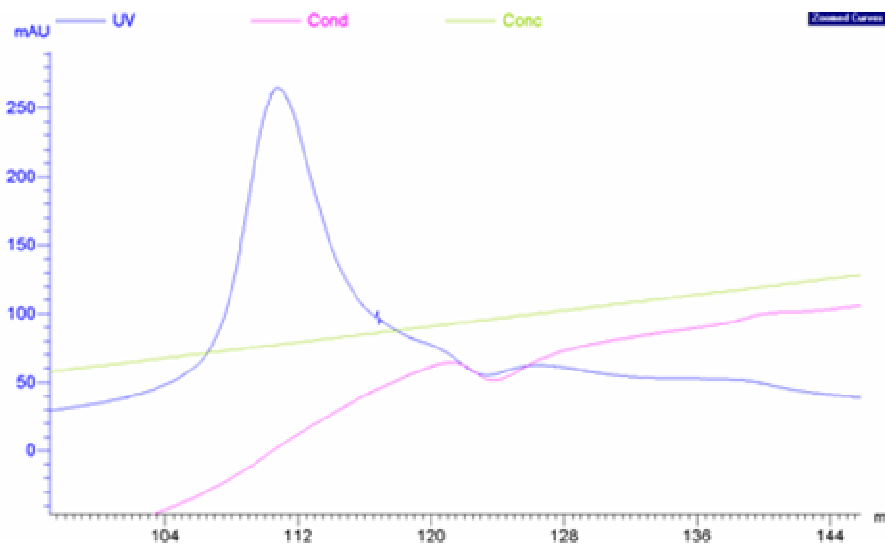


Abbildung 15: Chromatogramm einer Kationenaustauschchromatographie

Die Identität des Proteins wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Abbildung 16 zeigt für die rechte Probe eine deutliche Bande im Bereich der Masse der HIV-1 Protease von nahezu 11 kDa. Links ist ein Größenmarker aufgetragen; die zwei unteren Banden zu 6,5 kDa und 14 kDa gehen ineinander über.

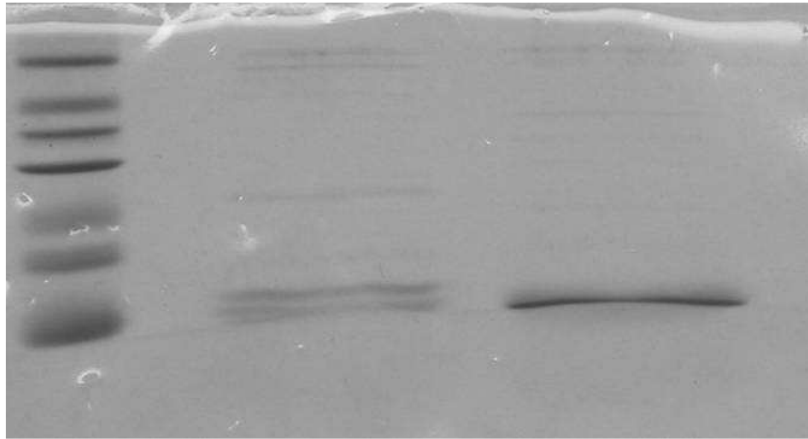


Abbildung 16: Gelelektrophoretische Bestimmung der Identität der HIV-1 Protease

Die Expression und Aufreinigung der HIV-1 Protease wurde in großen Teilen durchgeführt wie in der Literatur [53] beschrieben, jedoch anhand eigener Erfahrungen variiert und optimiert.

2.2.2 Enzymassay

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der HIV-1 Protease und der Bindungsaffinität verschiedener Inhibitoren wurde ein kompetitiver Fluoreszenzassay durchgeführt. Dabei katalysierte die HIV-1 Protease die Spaltung des von den Schnittstellen des viralen gag-pol-Polypeptids abgeleiteten fluorogenen Substrats Abz-Thr-Ile-Nle-p-nitro-Phe-Gln-Arg-NH₂. Durch die Spaltung zwischen Norleucin und dem Fluoreszenzakzeptor para-Nitrophenylalanin wurde die im intakten Substrat vorhandene Fluoreszenzlösung unterbrochen. Die Fluoreszenz des 2-Aminobenzoyl-Fluorophors wurde mit Hilfe des Microplate-Readers Safire II der Firma Tecan bei einer Wellenlänge von 337 nm angeregt. Bei einer Wellenlänge von 410 nm wurde die Fluoreszenzstrahlung emittiert und über die Zeit detektiert [54].

Experimentelle Durchführung

Das Substrat wurde zu einer Konzentration von 1 mM in DMSO gelöst. Ein Substrat-Puffer-Gemisch wurde aus 2% der Substratlösung, 97,09 % Assaypuffer und 0,01% Triton X-100 hergestellt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Inhibitoren wurden je nach Löslichkeit zu 100 mM oder 50 mM in DMSO gelöst und ebenfalls bei -20°C aufbewahrt. Bei Verwendung der Inhibitorstammlösung im Assay ergab sich eine finale Konzentration von 1 mM oder 500 µM als höchster Wert der Ver-

dünnungsreihe. Die Inhibitorlösung wurde für die weiteren Lösungen der Verdünnungsreihe jeweils im Verhältnis 1:1 mit DMSO verdünnt. Zumeist wurden 16 verschiedene Konzentrationen vermessen. Die von der Kationenaustauschersäule eluierte HIV-1 Protease wurde mit dem Assaypuffer im Verhältnis 1:20 verdünnt. Eine genaue Konzentrationsbestimmung war hier nicht möglich, da das Protein nicht vollständig aktiv zu sein schien bzw. in der Lösung ein Gleichgewicht zwischen aktivem Dimer und inaktivem Monomer bestand. Mit fortgeschrittener Lagerungsdauer nahm die Aktivität des Proteins weiter ab, so dass mit der Zeit eine geringere Verdünnung mittels Assaypuffer, zum Beispiel im Verhältnis 1:10, eingesetzt wurde.

Für die Messung wurden jeweils 178 µl Substrat-Puffer-Gemisch, 2 µl Inhibitorlösung und 20 µl Proteinlösung verwendet. Zunächst wurden Substrat-Puffer-Gemisch und Inhibitorlösung in der Assayplatte miteinander vermischt. Die Proteinlösung wurde unmittelbar vor der Messung zum Starten der Reaktion hinzugegeben und zwischen den einzelnen Messungen auf Eis gelagert. Die emittierte Fluoreszenz wurde pro Ansatz für 60 Messzeitpunkte in Zeitabschnitten von jeweils 20 s ermittelt. Pro Messreihe wurden jeweils 2 Messungen ohne Inhibitorlösung durchgeführt.

Bei niedrig affinen oder schlecht löslichen Inhibitoren war es auch möglich, ein größeres Volumen der Inhibitorlösung zu verwenden. Bis zu einer DMSO-Konzentration von maximal 10% konnte kein Einfluss auf die Resultate der Messung festgestellt werden. Die in der Dissertation von Jark Böttcher [50] beschriebene Verwendung von BSA als Trägerprotein in einer Konzentration von 1 mg/ml in diesem Assay wurde in der vorliegenden Arbeit in Frage gestellt und folglich vermieden. Inhibitor-moleküle können in hohem Maß von BSA gebunden werden und würden dann nicht mehr in freier Form für die Inhibition der HIV-1 Protease zur Verfügung stehen. Um aber dennoch eine unspezifische oder vorgetäuschte Inhibition durch Aggregation zu vermeiden, sollte immer ein Detergens dem Assay hinzugefügt werden. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich Triton X-100 in einer Konzentration von 0,01 % eingesetzt, aber auch Tween 20 erwies sich als geeignet. Die Verwendung dieser Detergentien in diesem Konzentrationsbereich wird in der Literatur zur Verhinderung einer unspezifischen Aggregation empfohlen.[55-57] In an diese Arbeit anschließenden Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass bei Verwendung von Triton X-100 und Tween 20 in einer höheren als der hier verwendeten Konzentration die Inhibition der HIV-1 Protease durch manche Inhibitoren signifikant reduziert werden kann. Daraus ist zu schließen, dass detaillierte Studien zur Auswahl des am besten geeigneten Detergens und dessen Konzentration erfolgen soll-

ten, um sicher zu gehen, dass solche Effekte keinen Einfluss auf die Hemmwirkung der Inhibitoren nehmen. Jedoch sollten auch bei Beobachtung einer Enzyminhibition bei fehlendem Einsatz eines Detergens die erhaltenen Werte kritisch betrachtet werden, da unspezifische Aggregationsphänomene eine Verfälschung der Ergebnisse verursachen können. Die detaillierten Erkenntnisse zu den beschriebenen Abhängigkeiten von den eingesetzten Detergentien kamen erst in Untersuchungen im Anschluss an diese Dissertation zu Tage (Klee, N., Linde, K., persönliche Mitteilung), so dass sie in der vorliegenden Arbeit keine weitergehende Berücksichtigung finden können.

Der Assay wurde für den HIV-1 Protease Wildtyp und die Mutante Q7K L33I L63I äquivalent durchgeführt.

Auswertung

Die Enzymaktivität bei den verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurde durch Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion ermittelt. Dazu wurde eine Ausgleichsgerade durch den linearen Bereich der erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurve gelegt und deren Steigung ermittelt. Durch das Auftragen der Anfangsgeschwindigkeit gegen die jeweilige Inhibitorkonzentration liess sich mit Hilfe des Programms GraFit 4.09 [58] der IC_{50} -Wert mittels folgender Formel bestimmen:

$$y = \frac{Range}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s} + y_0$$

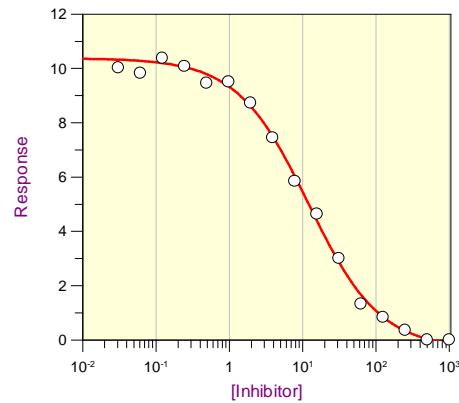
y = Anfangsgeschwindigkeit

Range = maximaler Bereich für y

x = Inhibitorkonzentration

s = slope factor / Neigung der Kurve

y_0 = Hintergrund



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	10,7106	0,3248
IC 50	11,9922	1,1633
Slope factor	0,8922	0,0702
Background	-0,3333	0,2469

Abbildung 17: Bestimmung des IC_{50} -Wertes des Inhibitors NK 101

Der IC_{50} -Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, bei der 50% der Proteinmoleküle inhibiert vorliegen. Mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung [59] lässt sich aus dem IC_{50} -Wert unter Einbeziehung der Affinität des Proteins zum Substrat der K_i -Wert berechnen.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[Substrat]}{K_m}\right)}$$

Bei Verwendung der oben beschriebenen Volumina betrug die Substratkonzentration 17,8 μ M. Der die Affinität zum Substrat beschreibende K_m -Wert für den HIV-1 Protease-Wildtyp wurde von Jark Böttcher zu 14,6 μ M [60] berechnet. Der K_m -Wert für die Mutante Q7K L33I L63I wurde in dieser Arbeit nach Lineweaver und Burk zu 8,4 μ M bestimmt.

2.2.3 Kristallisation der HIV-1 Protease

Dialyse des Proteins

Zur Verwendung für die Kristallisation musste das Protein mittels Dialyse in den Kristallisationspuffer überführt werden. Für den HIV-1 Protease Wildtyp und die Mutante Q7K L33I L63I wurden unterschiedliche Kristallisationspuffer verwendet, siehe Tabelle 2. Für den Pufferaustausch wurde ein Schlauch aus einer Dialysemembran mit einem Ausschlussvolumen von 3500 Da verwendet. Dieser wurde zuvor mit Wasser gespült,

um etwaige Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde der Schlauch mit der Proteinlösung befüllt und diese gegen 2 l Kristallisationspuffer im Kühlraum bei 5°C dialysiert. Der Puffer wurde jeweils nach 1 h und nach 3 h gewechselt und die Dialyse anschließend über Nacht fortgesetzt.

Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung

Nach dem Pufferaustausch wurde das Protein zur Verwendung für die Kristallisation auf eine Konzentration von 3 bis 5 mg/ml ankonzentriert. Dabei wurde ein Zentrifugalkonzentrator mit einem Ausschlussvolumen von 5000 Da verwendet. Etwaige Präzipitationen während der Konzentrierung wurden abzentrifugiert und verworfen. Die Konzentration des Proteins wurde photometrisch durch Messung der UV-Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

Berechnet wurde die Konzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz [61]:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot d$$

A = gemessene Absorption

c = Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]

ε = spezifischer Absorptionskoeffizient der HIV-1 Protease (Wildtyp und Mutante Q7K L33I L63I) = 1,157 [ml/mg·cm]; berechnet mit dem Programm protparam[52]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Im Anschluss wurde die Proteinlösung bei -80°C gelagert.

Kristallisation von HIV-1 Protease – Inhibitor – Komplexen

Zur Kristallisation der HIV-1 Protease im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren wurde, wie zuvor beschrieben, eine Proteinkonzentration von 3 bis 5 mg/ml eingesetzt. Die Proteinlösung wurde zunächst mit dem jeweiligen Inhibitor, der in einer finalen Konzentration von 1 bis 2 mM eingesetzt wurde, für 2 h auf Eis inkubiert. Die Inhibitoren wurden in DMSO vorwiegend zu einer Konzentration von 100 mM gelöst. Bei reduzierter Löslichkeit der Inhibitoren wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 50 mM eingesetzt. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 3 min und 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand für die Kristallisationsansätze verwendet. Die Kristallisation erfolgte mittels der Methode der Dampfdiffusion am sitzenden Tropfen (*Sitting Drop*). Für den HIV-1 Protease-Wildtyp und die Mutante Q7K L33I L63I wurden unterschiedliche Kristallisationslösungen im Reservoir verwendet:

Reservoirlösung Wildtyp: 2,5 – 3,5 M Natriumchlorid, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5

Reservoirlösung Mutante Q7K L33I L63I: 0,3 – 1 M Natriumchlorid, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,5, 0,1 M DTT, 0,003 M Natriumazid

Es wurde jeweils ein Volumen von 1 ml Reservoirlösung eingesetzt. Ein Tropfen setzte sich aus jeweils 1 µl der Protein-Inhibitor-Lösung und 1 µl der Reservoirlösung zusammen. Der Ansatz äquilibrierte bei 16 bis 18°C für 24 h. Konnte dann kein Kristallwachstum beobachtet werden, wurden mit Hilfe eines Pferdehaares Mikrokristalle in den Ansatz eingebracht; diese Methode wird als *Streak-Seeding* bezeichnet. Die größten Kristalle ohne sichtbare Fehler wurden für die Datensammlung ausgewählt.

Soaking von Fragmenten

Kristalle des Komplexes der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 101 wurden für *Soaking*-Experimente mit acht verschiedenen Fragmenten verwendet. Die Fragmente wurden in einer Ausgangskonzentration von 1 M in DMSO eingesetzt. Die Kristalle wurden in Tropfen mit einem Volumen von 10 µl überführt, die zusätzlich zur Reservoirlösung jeweils ein Fragment in einer finalen Konzentration von 10 bis 40 mM enthielten. Das *Soaking* wurde bei der höchstmöglichen Fragmentkonzentration und über eine Zeitspanne von 30 bis 90 min durchgeführt, bis die Kristalle sichtbare Schäden, wie z.B. Risse, zeigten.

2.2.4 Röntgenstrukturanalyse und Strukturverfeinerung

Datensammlung und Prozessierung

Zur Vorbereitung auf die Datensammlung wurden die Proteinkristalle in eine Lösung aus 75% Reservoirlösung und 25 % eines Kryoprotektivums, entweder Glycerol oder PEG 400, überführt. Anschließend wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Datensammlung erfolgte bei 100 K. Ein Großteil der Datensätze wurde mit Hilfe von Synchrotronstrahlung an der Beamline 14.2 des Synchrotron BESSY II, Berlin, und am Synchrotron SLS, Villigen, Schweiz, gesammelt. Einige Messungen erfolgten am *inhouse* Röntgendiffraktometer mit der Röntgenröhre IµS der Firma Incoatec und einem mar345-Detektor. Die gesammelten Daten wurden mit dem Programmpaket HKL 2000 [62] prozessiert und skaliert.

Strukturbestimmung und Verfeinerung

Die Phasen wurden mittels der Methode des Molekularen Ersatzes mit Hilfe des Programms Phaser [63] bestimmt. Als Modell wurden für Daten in der Raumgruppe $P6_122$ die Koordinaten der Struktur mit dem PDB-Code 2ZGA [32] und für Daten in der Raumgruppe $P2_12_12$ die Struktur mit dem PDB-Code 2PQZ [64] verwendet. 5 % bis maximal 10,9 % der Daten wurden für die Berechnung des freien R-Wertes verwendet, mindestens allerdings 500 Reflexe.

Zu Beginn der Strukturverfeinerung mit dem Programm Phenix [65] wurden ein *Rigid Body Refinement* und eine Optimierung durch *Simulated Annealing* bei einer Starttemperatur von 5000°C durchgeführt. In den weiteren Schritten wurden in jeweils fünf Zyklen die individuellen Koordinaten und B-Faktoren und gegebenenfalls die Besetzung bei Vorliegen verschiedener Konformationen von Aminosäureseitenketten verfeinert. Zwischen den einzelnen Schritten der Verfeinerung wurden die Koordinaten der Struktur in $2F_o-F_c$ - sowie F_o-F_c Elektronendichtekarten mit dem Programm COOT [66] eingepasst. Nach der ersten Verfeinerung wurden die mit Hilfe des Programms SYBYL [67] erzeugten Koordinaten der an das Protein bindenden Liganden eingebaut. Geometrische *Restraints* für die Verfeinerung der Liganden wurden mit dem *Monomer Library Sketcher* des Programmpakets ccp4 [68] erzeugt und in den weiteren Verfeinerungsschritten verwendet. Wassermoleküle wurden sowohl manuell als auch automatisiert während der Verfeinerung in die Elektronendichte eingepasst. Eine anisotrope Verfeinerung der B-Werte wurde bei den Strukturen mit den PDB-Codes 3QN8, 3QP0 und 3QIH durchgeführt. Ramachandran-Plots wurden mit dem Programm PROCHECK [69] erstellt. RMSD-Berechnungen wurden mit dem Programm ProFit [70] durchgeführt, nach dem die Strukturen unter Verwendung des im Programm implementierten McLachlan-Algorithmus' [71] überlagert wurden. Der Matthews-Koeffizient und der Lösungsmittelgehalt wurden mit Hilfe des Servers unter www.ruppweb.org/Mattprob berechnet. [72] [73]

Die Wechselwirkungen, die Liganden zum Protein in den Kristallstrukturen der Komplexe eingehen können, wurden mit dem Programm CONTACSYM [74] bestimmt. Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen der Strukturen wurden mit dem Programm PyMOL [75] erstellt.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Multiple Bindungsmodi Pyrrolidin-basierter Inhibitoren der HIV-1 Protease

Einleitung

Im strukturbasierten Wirkstoffdesign werden meist ganze Serien strukturell ähnlicher Liganden als Inhibitoren für ein Protein synthetisiert und in einem Assay auf ihre Bindungsaffinität überprüft. Für die Strukturbestimmung von Protein-Ligand-Komplexen mittels Röntgenkristallographie werden aber häufig nur ausgewählte Verbindungen einer Serie verwendet, da der Zeitaufwand relativ hoch ist. Außerdem ist die Hypothese weit verbreitet, dass strukturell ähnliche Liganden auch eine ähnliche Bindung zum Protein eingehen [76]. Dass dies aber nicht immer der Fall sein muss, wurde bereits in der Literatur beschrieben [77] und zeigt ebenfalls die nachfolgende Studie mit einer Serie symmetrisch-disubstituierter Pyrrolidine als Inhibitoren der HIV-1 Protease.

Die nachfolgende Abbildung zeigt das Grundgerüst dieser Inhibitorserie. Die Sulfonamid-Benzyl-Gruppen des Inhibitor-Grundgerüsts wurden mit Substituenten in para-Position verschiedener physikalischer Eigenschaften variiert. Anhand der Affinitätswerte ist jedoch keine klare Präferenz für einen bestimmten Typ der Substituenten erkennbar. [32] Die Bindungsaffinitäten der Inhibitoren AB 108 und ST 151 sind jedoch deutlich höher als die der Inhibitoren ST 152 und ST 154.

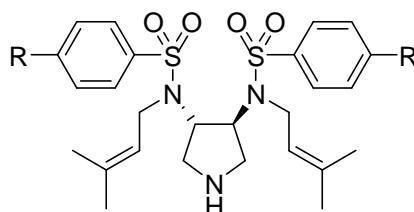


Abbildung 18: Grundgerüst der Inhibitorserie

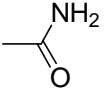
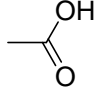
Bezeichnung des Inhibitors	R	K _i [μM]
AB 108		0,48
ST 151	—Br	0,69
ST 152	—C≡N	2,3
ST 154		3,3

Tabelle 3: K_i-Werte der Inhibitorserie [32]

Der Inhibitor AB 108 (siehe Tabelle 3) wurde im Komplex mit dem HIV-1 Protease – Wildtyp kristallisiert. Überraschenderweise wuchsen Kristalle in zwei unterschiedlichen Kristallformen bei sehr ähnlichen Kristallisationsbedingungen, die sich nur geringfügig in der Konzentration des Präzipitanten Natriumchlorid unterschieden. Bei der Verwendung einer Konzentration von 3,0 M Natriumchlorid kam es zur Ausbildung von nadelförmigen Kristallen, die nach der Datensammlung der hexagonalen Raumgruppe P6₁22 zugeordnet werden konnten. Wurde die Konzentration des Natriumchlorids auf 3,5 M erhöht, wuchsen rechteckige Kristalle, korrespondierend mit der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁. [32]

Nachdem von beiden Kristallformen Datensätze gesammelt und die Strukturen verfeinert worden waren, wurde festgestellt, dass der Bindungsmodus des Inhibitors in den beiden Strukturen unterschiedlich ist. Der asymmetrische Bindungsmodus des Inhibitors in der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe (PDB-Code 3CKT) gleicht den zuvor erhaltenen Strukturen von Komplexen der HIV-1 Protease mit ähnlichen Inhibitoren [64]. In der Kristallstruktur der hexagonalen Raumgruppe (PDB-Code 2ZGA) bindet der Inhibitor C2-symmetrisch an das Protein. Die Wechselwirkung zwischen dem Pyrrolidinring und den katalytischen Aspartaten ist erhalten geblieben, jedoch ist die Besetzung der einzelnen Taschen durch die Seitenarme des Inhibitors in den beiden Strukturen genau entgegengesetzt. Dies zeigt die folgende Abbildung, in der die Koordinaten der Inhibitoren überlagert wurden. Der in türkis dargestellte Inhibitor zeigt den symmetrischen Bindungsmodus in der hexagonalen Raumgruppe, der in orange dargestellte die asymmetrische Bindung zum Protein in der orthorhombischen Raumgruppe.

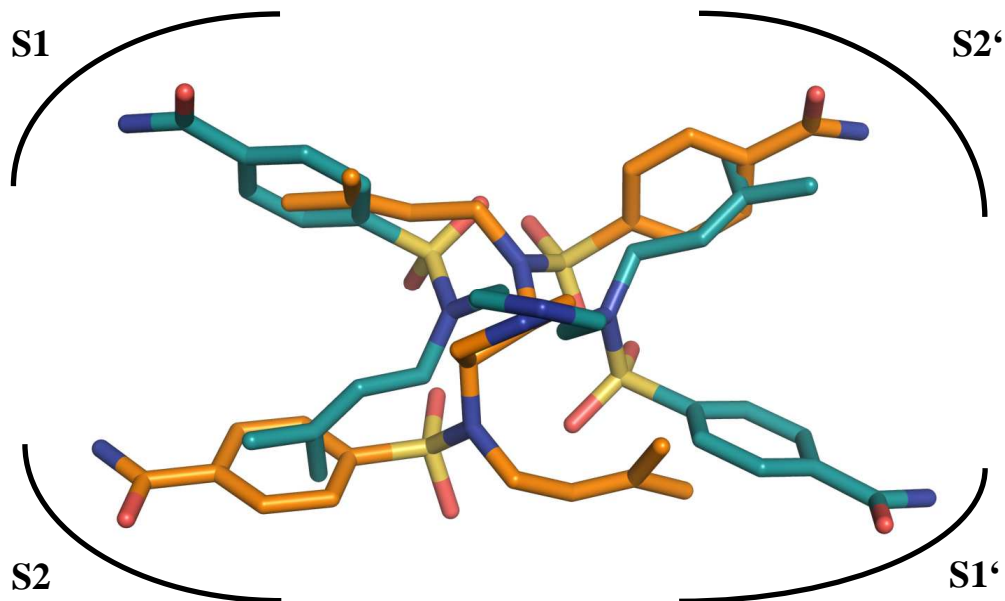


Abbildung 19: Bindungsmodi von AB 108 in der hexagonalen (türkis) und der orthorhombischen Raumgruppe (orange) [32]

Im folgenden Teil werden nun die Ergebnisse der Arbeiten mit weiteren Inhibitoren dieser Serie vorgestellt. Neue Kristallisationsansätze wurden durchgeführt, um herauszufinden, welche Komplexe in der jeweiligen Kristallform kristallisieren. Von den erhaltenen Kristallen wurden, soweit möglich, Datensätze aufgenommen und die Struktur der Komplexe bestimmt.

Ergebnisse

Co-Kristallisation der Inhibitoren mit der HIV-1 Protease

Die Inhibitoren ST 151, ST 152 und ST 154 wurden mit der HIV-1 Protease zur Co-Kristallisation angesetzt. Es konnte jedoch kein spontanes Kristallwachstum beobachtet werden. Nach *Streak-Seeding* mit Mikrokristallen der hexagonalen Raumgruppe wuchsen nadelförmige Kristalle in den Ansätzen mit den Inhibitoren ST 151 und ST 152, jedoch nicht im Fall von ST 154. Diese Ansätze wurden mit dem HIV-1 Protease Wildtyp durchgeführt. Im Anschluss daran wurde in Ansätzen der gleichen Inhibitoren mit der HIV-1 Protease Mutante Q7K L33I L63I ein *Streak-Seeding* mit Mikrokristallen der orthorhombischen Raumgruppe durchgeführt. Es konnte ein Wachstum plättchenförmiger Kristalle in allen Ansätzen beobachtet werden. Jedoch blieben die Kristalle klein und waren miteinander verwachsen. Überwiegend bildeten sie keine schöne Form aus. Von den Komplexen der HIV-1 Protease mit ST 151 und ST 152 gelang es nicht, für eine Datensammlung ausreichend große und formschöne Kristalle zu gewinnen. Die Qualität der Kristalle des Komplexes mit ST 154 war ausreichend, um einen dieser Kristalle für eine Datensammlung zu verwenden.

Datensammlung und Strukturverfeinerung

Mit Hilfe von Synchrotronstrahlung konnte am Synchrotron SLS ein Datensatz von einem Kristall in der hexagonalen Raumgruppe des HIV-1 Protease-Komplexes mit ST 151 gesammelt werden. Die kristallographischen Parameter, die die Struktur des Komplexes mit ST 151 beschreiben, sind in Tabelle 4 aufgeführt. Den Daten konnte, wie bei der Struktur des Komplexes mit dem PDB-Code 2ZGA, durch die Methode des Molekularen Ersatzes die Raumgruppe $P6_122$ zugeordnet werden. In dieser Raumgruppe besteht die asymmetrische Einheit aus einem Monomer der HIV-1 Protease. Durch eine C2-Symmetrie ergibt sich das funktionale Dimer. Der C2-symmetrische Inhibitor bindet somit ebenfalls symmetrisch. Aufgrund programmtechnischer Einschränkungen konnte die Struktur jedoch nicht in der Raumgruppe $P6_122$ verfeinert werden. Bei der Verwendung des Programms PHENIX [65] war es nicht möglich, geometrische *Restraints* für die Bindungslängen und Bindungswinkel des Liganden, die die Symmetrieachse miteinbeziehen, zu erzeugen und zu verwenden. Diese Option beinhaltet zwar das Strukturverfeinerungsprogramm SHELXL [78], welches aber bei der vorliegenden Auflösung der Struktur von 2.45 Å nicht geeignet war. Somit wurde die Struktur in der

Raumgruppe $P6_1$ verfeinert, in der die asymmetrische Einheit aus einem HIV-1 Protease Dimer besteht. Dies verdoppelte die Zahl der zu verfeinernden Parameter. Aufgrund der niedrigen Auflösung ist die Gesamtanzahl der Reflexe niedrig und das Parameter-zu-Beobachtungen-Verhältnis relativ klein. Für die Berechnung des freien R-Faktors konnte somit auch nur eine geringe Anzahl von Reflexen verwendet werden, so dass dieser verhältnismäßig hoch ausfällt und eine große Abweichung zum R-Faktor aufweist. Die Elektronendichte in der Bindetasche definiert insgesamt gut die Struktur des Liganden. Jedoch wurden die Bromatome an den Phenylringen vermutlich während der Datensammlung am Synchrotron aufgrund eines signifikanten Strahlenschadens abgespalten, da diese durch die Elektronendichtekarte nicht definiert werden.

Von einem Komplex mit dem Inhibitor ST 152 in der hexagonalen Raumgruppe konnten mit Hilfe von Synchrotronstrahlung an der Beamline 14.2 des Synchrotrons BESSY II lediglich Daten bis zu einer Auflösung von 2.85\AA gesammelt werden. Es wurden einige Verfeinerungszyklen durchgeführt. Jedoch definierte die Elektronendichte in der Bindetasche nicht ausreichend die Position des Liganden, um diesen in die Struktur einzubauen. Somit wurde diese Struktur nicht weiter verfeinert und soll hier im folgenden nicht weiter beschrieben werden.

Ein weiterer Datensatz wurde von dem Komplex mit ST 154 in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12$ an der Beamline 14.2 des Synchrotron BESSY II gesammelt. Die kristallographischen Parameter, die die Struktur des Komplexes mit ST 154 beschreiben, sind ebenfalls in Tabelle 4 aufgeführt. Durch Vereisungen am Kristall kam es zum Auftreten von Eisringen, die die Auswertung der Reflexe in den betreffenden Auflösungsbereichen störte. Im Bereich von 1.98\AA bis 1.87\AA ist somit die Vollständigkeit der Daten auf 80,0% reduziert. Die R-Faktoren der Verfeinerung sind in dieser Auflösungsschale und damit auch in gesamten Struktur daher verhältnismäßig hoch. Die Elektronendichte in der Bindetasche des Proteins definiert den Liganden nicht vollständig, jedoch soweit, dass der generelle Bindungsmodus erkennbar ist. Die Besetzung des Liganden wurde auf 73% verfeinert.

Bezeichnung der Struktur	HIV-1 PR – ST 151	HIV-1 PR – ST 154
Datensammlung und Prozessierung		
Wellenlänge [Å]	1.00	0.91841
Raumgruppe	P6 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszellparameter [Å; °]	a, b = 62.9, c = 82.4; α , β = 90.0, γ = 120.0	a = 57.4, b = 85.9, c = 46.5; α , β , γ = 90.0
Auflösungsbereich [Å]	30.00-2.45 (2.51-2.45)	50.00-1.63 (1.67-1.63)
Anzahl einzigartiger Reflexe	6876 (454)	28987 (1936)
R _{sym} [%]	10.5 (47.9)	8.0 (46.4)
Vollständigkeit [%]	99.9 (100.0)	98.5 (99.9)
Redundanz	6.0 (6.1)	4.4 (4.5)
I / σ	18.8 (3.6)	15.8 (3.0)
Matthews-Koeffizient [Å ³ /Da]	2.2	2.7
Lösungsmittelgehalt [%]	43.5	53.6
Strukturverfeinerung		
Auflösungsbereich [Å]	29.38-2.45	36.13-1.63
Anzahl der Reflexe für die Verfeinerung	6106	27558
Anzahl der Reflexe im Testdatensatz	747	1412
R-Faktor [%]	18.1	22.1
Freier R-Faktor [%]	29.2	26.3
RMSD-Werte		
Bindungslängen [Å]	0.008	0.006
Bindungswinkel [°]	1.150	1.157
Durchschnittliche B-Werte		
Protein	32.1	17.2

Inhibitor	48.0	25.5
Wasser	28.8	27.6
Weitere Liganden	32.6	23.9
Ramachandran Plot		
Aminosäuren in bevorzugten Regionen [%]	93.0	96.2
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen [%]	7.0	3.8
Sonstiges		
Anzahl der Aminosäuren	198	198
Anzahl der Atome des Inhibitors	35	33
Anzahl der Wassermoleküle	62	226
Anzahl der Atome weiterer Liganden	2	3

Tabelle 4: Kristallographische Tabelle zu den Strukturen HIV-1 PR-ST151 und HIV-1 PR-ST154

Die oben beschriebenen Einschränkungen in der Qualität der beiden Strukturen reduzieren nicht ihre Aussagekraft in Bezug auf die Bindungsmodi der Inhibitoren. Dennoch wurde beschlossen, die Koordinaten der Strukturen nicht in der Proteindatenbank zu hinterlegen.

Bindungsmodus des Inhibitors ST 151 in der Struktur der hexagonalen Raumgruppe

Der Inhibitor ST 151 bindet symmetrisch an die HIV-1 Protease, vergleichbar mit dem Inhibitor AB 108 in der oben beschriebenen Struktur mit dem PDB-Code 2ZGA. Der zentrale Pyrrolidinring bildet ein Wasserstoffbrückennetzwerk zu den katalytischen Aspartaten im Abstand von jeweils 2.8Å und 2.9Å aus.

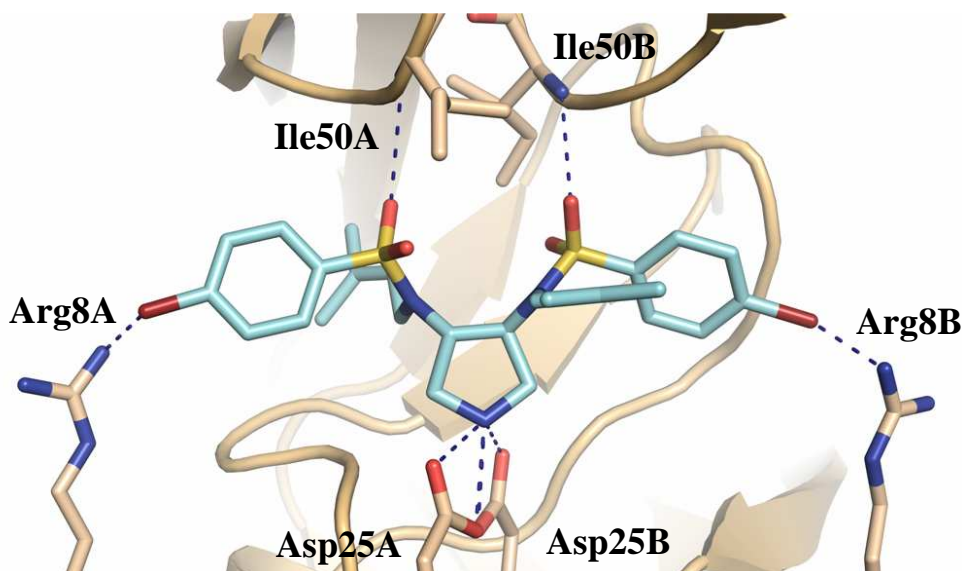


Abbildung 20: Bindungsmodus des Inhibitors ST 151. Der Inhibitor ist in hellblau, die HIV-1 Protease in beige und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind in blau mittels gestrichelter Linien dargestellt.

Die Interaktion mit den Aminosäuren Ile50A und Ile50B der Flapregion wird von jeweils einem Sauerstoff der Sulfonamidgruppe ausgebildet. Die Sulfonamidreste des Inhibitors adressieren die S1- und S1'-Tasche des Proteins. Der Bromsubstituent der Phenylringe wurde zwar während der Datensammlung abgespalten, jedoch wurde seine Position in para-Stellung analytisch mittels NMR-Messungen bestätigt, so dass er für die obenstehende Abbildung modellhaft ergänzt wurde. Der Abstand des Bromsubstituenten zu Arg8A bzw. Arg8B beträgt 2.6Å, so dass jeweils eine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann. Diese ist jedoch mit Brom als Akzeptor wohl eher schwach. Der Abstand des Broms zum Stickstoff des Arginins scheint verhältnismäßig klein, eine solche Distanz liegt üblicherweise im Bereich 3.1 bis 3.8Å [79]. Die das HIV-1 Protease Dimer stabilisierende ionische Wechselwirkung zwischen Arg8 und Asp29 wird durch die Wasserstoffbrücke zum Inhibitor nicht gestört und kann weiterhin ausgebildet werden. Die Dimethylallylreste des Inhibitors besetzen die S2- und S2'-Tasche des Proteins, wobei van-der-Waals-Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Ala28, Val32, Ile47 und Ile50 bestehen.

Strahlungsinduzierte Abspaltung des Broms während der Datensammlung

Die Elektronendichte in der Bindetasche der HIV-1 Protease definiert gut die Struktur des Inhibitors ST 151, mit Ausnahme der Bromsubstituenten an den Phenylringen, wie die folgende Abbildung zeigt. Die Vollständigkeit des zur Kristallisation eingesetzten Inhibitors wurde mittels massenspektrometrischer Untersuchungen der verwendeten Lösung bestätigt.

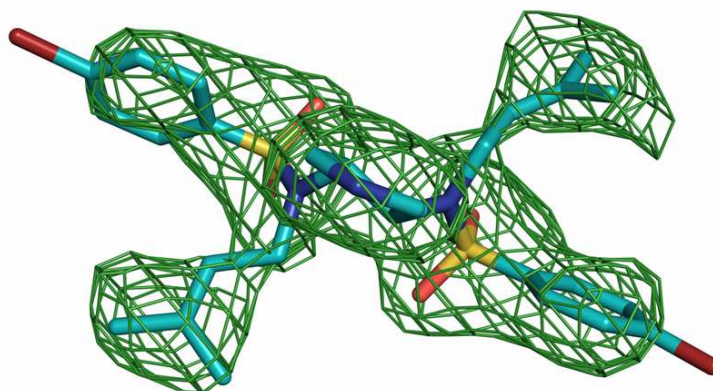


Abbildung 21: F_o-F_c -Elektronendichtekarte (grün) für ST 151 (hellblau);
 σ -Level: 1.5

Somit muss die kovalente Bindung zwischen dem anomalen Streuelement Brom und dem Phenylring während der Datensammlung gespalten worden sein. Der Datensatz wurde am Synchrotron SLS bei einer Wellenlänge von 1.00\AA , die nah an der Absorptionskante der Brom-Kohlenstoff-Bindung von 0.9204\AA liegt, gesammelt. Die abgespaltenen Bromatome verteilten sich vermutlich über den gesamten Kristall, da kein Elektronendichtemaximum dem Brom zugeordnet werden konnte, weder in der Bindetasche noch an einer anderen Position im Protein.

Ein weiterer Datensatz des gleichen Komplexes wurde am Synchrotron BESSY II bei einer Wellenlänge von 0.91841\AA gesammelt. Auch hier konnte keine die Bromsubstituenten definierende Elektronendichte beobachtet werden. Aufgrund des eher geringen Streuvermögens der nadelförmigen Kristalle war es nicht möglich, einen Datensatz am *inhouse*-Röntgendiffraktometer bei einer Wellenlänge von 1.5418\AA , die stärker von der Absorptionskante abweicht, zu sammeln.

Das Phänomen der strahlungsinduzierten Spaltung einer kovalenten Br-C-Bindung wurde bereits in der Literatur beschrieben [80]. Es konnte in weiteren Studien der Ar-

beitsgruppe ebenfalls beobachtet und seine Abhängigkeit von der verwendeten Strahlendosis und der Wellenlänge der Röntgenquelle weiter erforscht werden [79].

Bindungsmodus des Inhibitors ST 154 in der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe

Der Inhibitor ST 154 bindet asymmetrisch an die HIV-1 Protease. Wie schon bei den zwei Bindungsmodi des Inhibitors AB 108 in den unterschiedlichen Raumgruppen beobachtet, bleibt die Wechselwirkung des Pyrrolidinrings mit Asp25A (2.9Å/3.0Å) und Asp25B (2.9Å/3.2Å) im Vergleich zur Bindung von ST 151 als einziges Motiv erhalten.

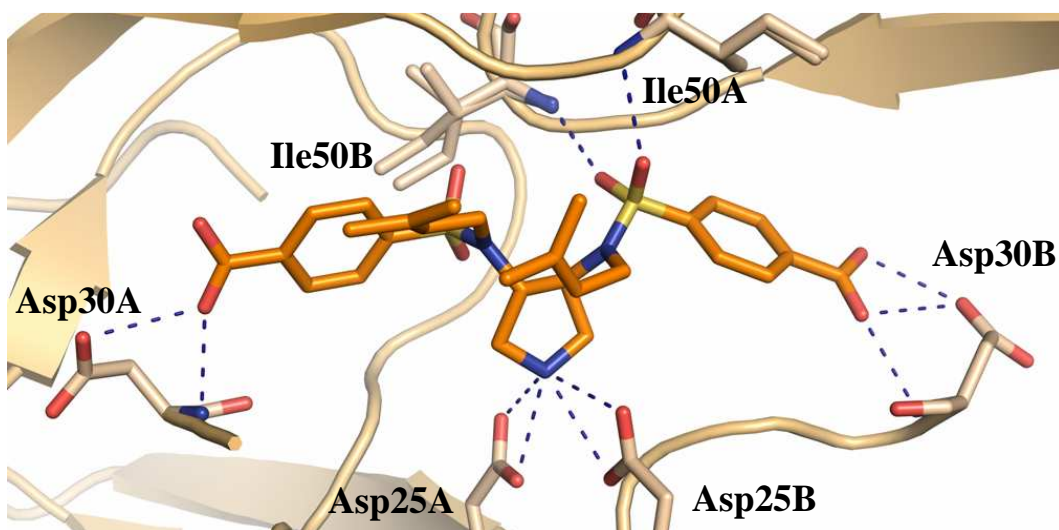


Abbildung 22: Bindungsmodus des Inhibitors ST 154. Der Inhibitor ist in orange, die HIV-1 Protease in beige und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind in blau mittels gestrichelter Linien dargestellt.

Die Sulfonamidreste des Inhibitors adressieren, vergleichbar mit AB 108 in der orthorhombischen Raumgruppe, die S2- und S2'-Tasche der HIV-1 Protease. Dabei können die Carboxylgruppen Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zur Seitenkette als auch zum Proteinrückgrat von Asp30A bzw. Asp30B ausbilden. Nur eine Sulfonamidgruppe interagiert hier über die Sauerstoffe mit den Aminosäuren Ile50A (2.80Å) und Ile50B (3.3Å) der Flap-Region. Die andere verbleibt uninvolviert. Die Dimethylallylreste des Inhibitors wurden nicht durch die Elektronendichte der Struktur definiert, wie Abbildung 23 zeigt, vermutlich aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit.

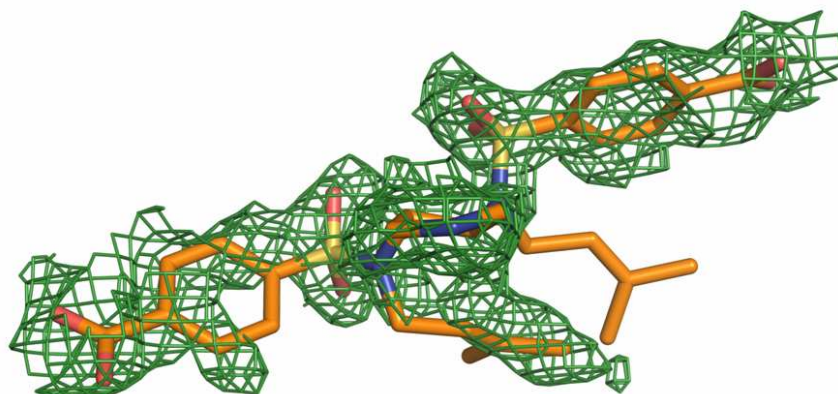


Abbildung 23: F_o-F_c -Elektronendichtekarte (grün) für ST 154 (orange)
 σ -Level: 1.5

Jedoch konnten die Sulfonamidgruppen eindeutig platziert werden, so dass sich aus geometrischen Gründen als Möglichkeit nur ergibt, dass die beiden Dimethylallylreste die S1'-Tasche des Proteins besetzen. In Abbildung 23 wird eine mögliche Position der Reste gezeigt. Die Dimethylallylreste können in der S1'-Tasche van-der-Waals-Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Gly49A, Pro81B und Ile84B ausbilden. Die S1-Tasche der HIV-1 Protease bleibt in dieser Komplexstruktur unbesetzt, im Gegensatz zur Struktur des Komplexes mit dem Inhibitor AB108, wie Abbildung 24 noch einmal verdeutlichen soll. In orange ist der Inhibitor ST 154 dargestellt, dessen beide Dimethylallylreste in die S1'-Tasche des Proteins ragen. Der Inhibitor AB 108, dargestellt in grau, besetzt dagegen mit jeweils einem Dimethylallrest die S1- und die S1'-Tasche. Hierdurch ergibt sich auch eine veränderte Position der betreffenden Sulfonamidgruppe.

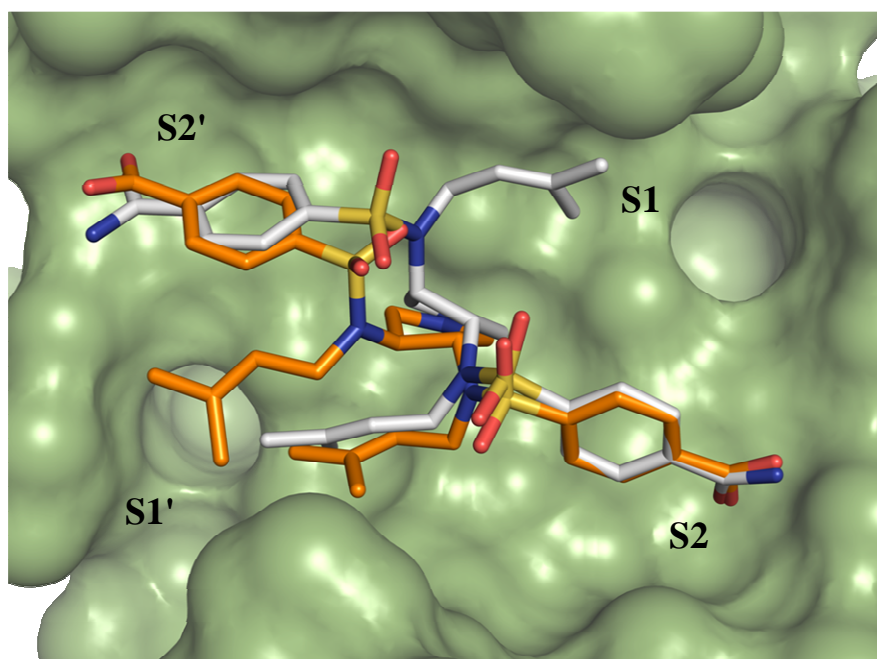


Abbildung 24: Überlagerung der Koordinaten von AB 108 (grau) und ST 154 (orange). Die Oberfläche der HIV-1 Protease ist in grün dargestellt.

Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Studie wurde der Bindungsmodus einer kleinen Serie von Inhibitoren der HIV-1 Protease überprüft. Ausgangspunkt waren zwei Komplexstrukturen mit dem Inhibitor AB 108, der in verschiedenen Raumgruppen einen unterschiedlichen Bindungsmodus einnahm, bei dem die Besetzung der Taschen des Proteins invertiert durch die Seitenketten des Inhibitors vorgenommen wurde. Es gelang, zwei weitere Komplexstrukturen zu bestimmen. Der Bindungsmodus von ST 151 in der hexagonalen Raumgruppe ist vergleichbar zu dem von AB 108. Auch ST 152 kristallisierte mit der HIV-1 Protease in der der hexagonalen Raumgruppe zugeordneten Kristallform, während in Ansätzen mit dem Inhibitor ST 154 kein erfolgreiches Kristallwachstum gelang. Dass eine Kristallisation von ST 154 in der hexagonalen Form nicht erfolgte, mag vielleicht daran liegen, dass eine Interaktion der Carboxylgruppen mit der Aminosäure Arg8 in der S1- und S1'-Tasche die das Dimer stabilisierende ionische Wechselwirkung zu Asp29 gestört hätte. Der Einfluss der apolaren Brom- und Cyanosubstituenten von ST 151 und ST 152 ist vermutlich vergleichsweise schwach. Alle Inhibitoren kristallisierten mit der HIV-1 Protease in der der orthorhombischen Raumgruppe zugeordneten Kristallform, wobei der Inhibitor ST 154 im Komplex mit der HIV-1 Protease die verhältnismäßig stabilsten Kristalle ausbildete. Der Bindungsmodus von ST 154 gleicht

weitgehend dem von AB 108 in dieser Raumgruppe, mit Ausnahme der Position der Dimethylallylreste. Diese Abweichung könnte zufällig in diesem Kristall vorliegen oder aber auch verantwortlich für die geringe Qualität der erhaltenen Kristalle sein. Die bevorzugte Co-Kristallisation mit Inhibitoren, die polare Substituenten tragen, lässt sich vermutlich über die stabile Wechselwirkung mit Asp30 in der S2- und S2'-Tasche erklären. Warum die Besetzung der Taschen in den zwei Raumgruppen unterschiedlich erfolgt, lässt sich nicht abschließend deuten, könnte aber gegebenenfalls auf unterschiedliche konformative Eigenschaften der individuellen Inhibitoren hindeuten.

Es verbleibt die Frage, ob die Packung der Moleküle im Kristall den Bindungsmodus des Inhibitors beeinflusst oder ob umgekehrt der Inhibitor zunächst in einer bestimmten Konformation bindet und sein Einfluss auf das Protein eine bestimmte Kristallform vorgibt. Inwieweit die Packung in den unterschiedlichen Raumgruppen mit der Symmetrie des Proteins und damit dem Bindungsmodus des Inhibitors zusammenhängt, soll im nachfolgenden Kapitel noch eingehender beleuchtet werden.

Da die beschriebenen Strukturen natürlich immer den Bindungsmodus eines Inhibitors in der kristallinen Form des Proteins zeigen, liegt die Frage nach der Konformation in der Lösung nahe. Wie könnte man also herausfinden, ob die Inhibitoren, deren Komplexe mit der HIV-1 Protease beide Kristallformen ausbilden, also AB 108, ST 151 und ST 152, auch in Lösung mehrere verschiedene Bindungsmodi eingehen? Mittels Methoden zur Bestimmung der Bindungsaffinität, zum Beispiel der Isothermen Titrationskalorimetrie oder der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, ließe sich vermutlich nur eine Aussage treffen, wenn die Affinität des jeweiligen Inhibitors in den verschiedenen Bindungsmodi ausreichend voneinander abweicht. Eine Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie, die bei einem verhältnismäßig kleinen Protein wie der HIV-1 Protease möglich ist, würde dagegen die Konformation der Komplexstrukturen in der Lösung zeigen können.

Würde sich das Vorliegen mehrerer Bindungsmodi der Inhibitoren in Lösung bestätigen, wäre dies interessant im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der Ausbildung von Resistenzen der HIV-1 Protease gegenüber ihren Inhibitoren. Solch "flexible" Inhibitoren könnten die Resistenzbildung verlangsamen, da sie in der Lage sind, durch alternative Bindungsmodi Mutationen des Virus aus dem Weg zu gehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bedeutung der Strukturaufklärung im Design von Wirkstoffen nicht unterschätzt werden sollte. Wie man sehen konnte, lässt sich die These, dass ähnliche Liganden auch einen ähnlichen Bindungsmodus zum Protein

eingehen, nicht immer halten. Deshalb sollten innerhalb solcher Serien von Liganden immer mehrere Komplexe mit dem jeweiligen Zielprotein strukturell aufgeklärt werden.

2.3.2 Symmetrieaspekte der Bindung eines Oligoamin-Inhibitors an die HIV-1 Protease

Einleitung

Lineare Oligoamine wurden in vorausgehenden Studien als neue Grundstrukturen für das Design von Inhibitoren verschiedener Aspartylproteasen ausgewählt [60]. Ein sekundäres Amin sollte die katalytischen Aspartate adressieren, wie schon zuvor bei Pyrrolidin-basierten Inhibitoren der HIV-1 Protease [64] und Piperidin-basierten Inhibitoren der humanen Aspartylprotease Renin [48] erfolgreich gezeigt werden konnte. Eine Serie von Inhibitoren mit variierenden Kettenlängen, verschiedenen, die Flap der Proteasen adressierenden, Akzeptorgruppen und unterschiedlichen Substituenten zur Optimierung der Taschenbesetzung wurde synthetisiert und kinetisch charakterisiert. Zwei C2-symmetrische Inhibitoren wurden im Komplex mit dem HIV-1 Protease Wildtyp in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12$ kristallisiert. Die Strukturaufklärung ergab einen asymmetrischen Bindungsmodus, wie auch im vorhergehenden Kapitel in dieser Raumgruppe beobachtet. [60]

Einer der Inhibitoren, KeLi033, wurde erneut synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit noch einmal zur Kristallisation im Komplex mit der HIV-1 Protease verwendet. Der K_i -Wert dieses Inhibitors wurde zu $0.9 \mu\text{M}$ bestimmt. [60] Es konnte ein spontanes Wachstum nadelförmiger Kristalle beobachtet werden, die, wie zuvor beschrieben, der hexagonalen Raumgruppe $P6_122$ zugeordnet werden konnten. Die Erkenntnisse aus der darauf folgenden Strukturaufklärung sollen in diesem Kapitel vorgestellt werden.

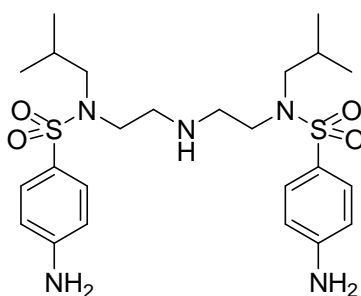


Abbildung 25: Strukturformel des Inhibitors KeLi 033

Ergebnisse

Co-Kristallisation des Inhibitors mit der HIV-1 Protease

Der Inhibitor KeLi 033 wurde mit dem HIV-1 Protease Wildtyp zur Kristallisation angesetzt. Spontan wuchsen nadelförmige Kristalle, die ohne Optimierung für eine Datensammlung verwendet werden konnten.

Datensammlung und Strukturverfeinerung

Mit Hilfe von Synchrotronstrahlung konnte von einem Komplex der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor KeLi 033 am Synchrotron SLS ein Datensatz mit einer Auflösung von 2.07 Å gesammelt werden. Nach ihrer Prozessierung konnte den Daten durch die Methode des Molekularen Ersatzes die hexagonale Raumgruppe $P6_122$ zugeordnet werden, die auch schon zuvor bei Kristallen dieser Ausformung vorlag. In dieser Raumgruppe enthält die asymmetrische Einheit des Kristalls ein Monomer der HIV-1 Protease. Im Gegensatz zur Struktur des Komplexes HIV-1 PR-ST 151 war es bei dieser Struktur möglich, die Raumgruppe $P6_122$ auch während der Verfeinerung mit dem Programm PHENIX zu verwenden. Denn in diesem Fall mussten keine über die Symmetrieachse hinausgehenden geometrischen *Restraints* für Bindungslängen und -winkel des Inhibitors, wie beim Pyrrolidinring von ST 151 erforderlich, verwendet werden. Während der Strukturverfeinerung wurde der sekundäre Stickstoff des Inhibitors, wie auch zwei Wassermoleküle, auf der Symmetrieachse fixiert. Die Elektronendichte in der Bindetasche der HIV-1 Protease definiert gut die Struktur und Anordnung des Liganden, wie Abbildung 26 zeigt.

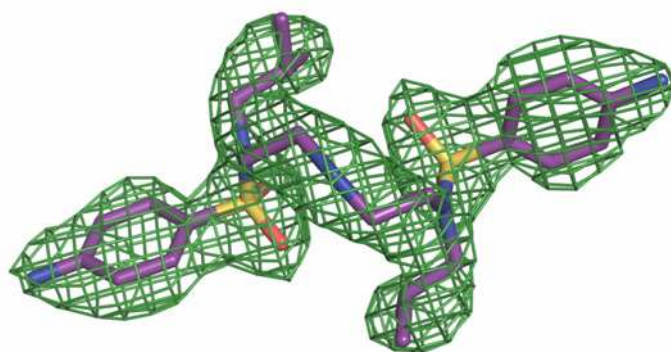


Abbildung 26: $F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte des Inhibitors KeLi 033
 σ -Level: 2.0

Die weiteren, die Struktur beschreibenden kristallographischen Parameter sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Koordinaten der Struktur wurden in der Proteindatenbank unter dem Code 3PSU deponiert.

Bezeichnung der Struktur	HIV-1 PR – KeLi033
Datensammlung und Prozessierung	
Wellenlänge [Å]	1.00
Raumgruppe	P6 ₁ 22
Einheitszellparameter [Å; °]	a, b = 62.7, c = 82.4 $\alpha, \beta = 90.0, \gamma = 120.0$
Auflösungsbereich [Å]	40.00-2.07 (2.13-2.07)
Anzahl einzigartiger Reflexe	6294 (506)
R _{sym} [%]	9.6 (51.4)
Vollständigkeit [%]	99.8 (99.8)
Redundanz	8.0 (7.4)
I / σ	22.2 (3.6)
Matthews-Koeffizient [Å ³ /Da]	2.2
Lösungsmittelgehalt [%]	43.2
Strukturverfeinerung	
Auflösungsbereich [Å]	32.82-2.07
Anzahl der Reflexe für die Verfeinerung	5701
Anzahl der Reflexe im Testdatensatz	550
R-Faktor [%]	18.4
Freier R-Faktor [%]	24.4
RMSD-Werte	
Bindungslängen [Å]	0.007
Bindungswinkel [°]	1.112

Durchschnittliche B-Werte	
Protein	28.4
Inhibitor	30.0
Wasser	34.6
Weitere Liganden	32.2
Ramachandran-Plot	
Aminosäuren in bevorzugten Regionen [%]	94.9
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen [%]	5.1
Sonstiges	
Anzahl der Aminosäuren	99
Anzahl der Atome des Inhibitors	18
Anzahl der Wassermoleküle	69
Anzahl der Atome weiterer Liganden	1
PDB-Code	3PSU

Tabelle 5: Kristallographische Tabelle zu der Struktur HIV-1 PR-KeLi033

Bindungsmodus des Inhibitors KeLi 033 in der Struktur der hexagonalen Raumgruppe im Vergleich zu der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe

In der hexagonalen Raumgruppe P6₁22 bindet der symmetrische Inhibitor KeLi 033 C2-symmetrisch an die HIV-1 Protease. Das sekundäre Amin adressiert die katalytischen Aspartate. In der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe (PDB-Code 3BGB) bindet der Inhibitor asymmetrisch an das Protein. Hier besteht eine Wechselwirkung nur zu einem der katalytischen Aspartate, wie Abbildung 28 zeigt. [60]

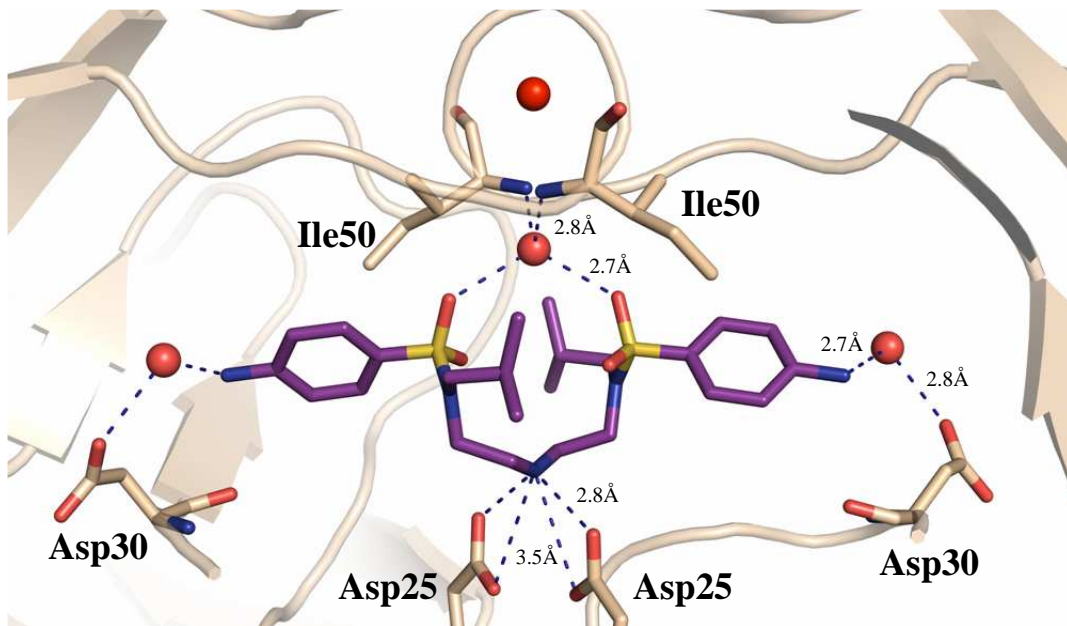


Abbildung 27: Bindungsmodus von KeLi 033 in der Struktur der hexagonalen Raumgruppe

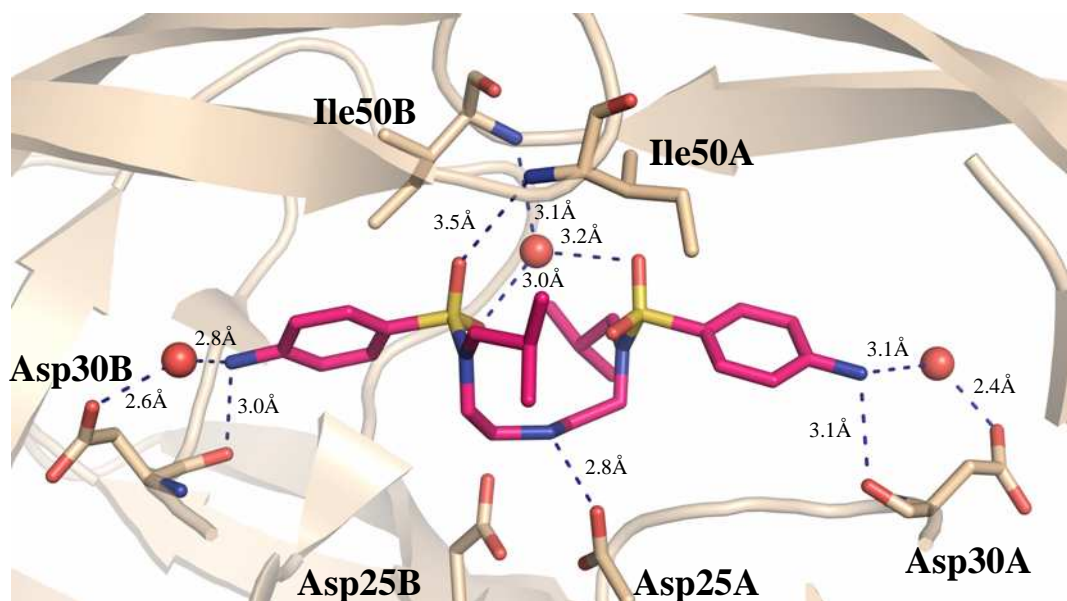


Abbildung 28: Bindungsmodus von KeLi033 in der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe [60]

Die Besetzung der Taschen der HIV-1 Protease erfolgte in beiden Kristallformen gleich, im Gegensatz zu dem in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Phänomen. Die Isobutylreste adressieren in beiden Fällen die S1- und S1'-Tasche der HIV-1 Protease. Die *p*-Aminobenzylsulfonamidgruppen besetzen die S2- und S2'-Tasche des Proteins, wobei sich das Interaktionsmuster in den beiden Strukturen hier unterscheidet. In der Struktur der hexagonalen Raumgruppe interagiert die Aminofunktion über ein Wassermolekül mit der

Seitenkette der Aminosäure Asp30. Diese Interaktion kann man auch in der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe beobachten, jedoch ist hier zusätzlich die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff des Proteinrückgrats von Asp30A und Asp30B möglich. In der Struktur der hexagonalen Raumgruppe ist der vergleichbare Abstand mit 3.6\AA so weit, dass man die Wechselwirkung nicht mehr als Wasserstoffbrückenbindung beschreiben würde.

In beiden Strukturen besteht eine Wechselwirkung der Sauerstoffe der Sulfonamidgruppen mit den Aminosäuren der Flap-Region der HIV-1 Protease. In der Struktur der hexagonalen Raumgruppe verläuft diese Interaktion symmetrisch über ein Wassermolekül, welches sich direkt auf der Symmetrieachse befindet und Wasserstoffbrückenbindungen zum Rückgrat der beiden Ile50-Aminosäuren ausbilden kann. In Abbildung 27 sind alle dem Abstandslimit entsprechenden Wasserstoffbrückenbindungen gezeigt. In der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe gibt es ebenfalls Interaktionen der beiden Sulfonamidgruppen, die über ein Wassermolekül vermittelt werden. Diese sind hier jedoch asymmetrisch, so dass sich auch das Wassermolekül an einer anderen Position befindet als in der zuvor beschriebenen Struktur. Weiterhin befindet sich ein Sauerstoff einer Sulfonamidgruppe in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu Ile50B, so dass hier eine zusätzliche direkte Interaktion ausgebildet werden kann.

Die Unterschiede in der Symmetrie der Interaktionen der Sulfonamidgruppen mit der Flap-Region ergeben sich auch durch die unterschiedliche Konformation der Aminosäuren Ile50 und Gly51 in den beiden Strukturen. Abbildung 29 zeigt, dass die Flap-Aminosäuren in der Struktur der hexagonalen Raumgruppe symmetrisch vorliegen, während sie, wie Abbildung 30 zeigt, in der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe durch einen Flip des Ile50-Gly51-Dipeptids eine asymmetrische Anordnung einnehmen.

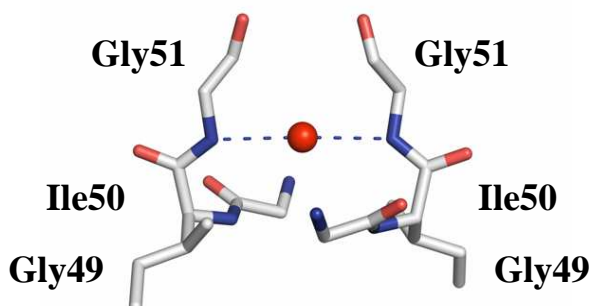


Abbildung 29: Flap-Aminosäuren in der Struktur der hexagonalen Raumgruppe

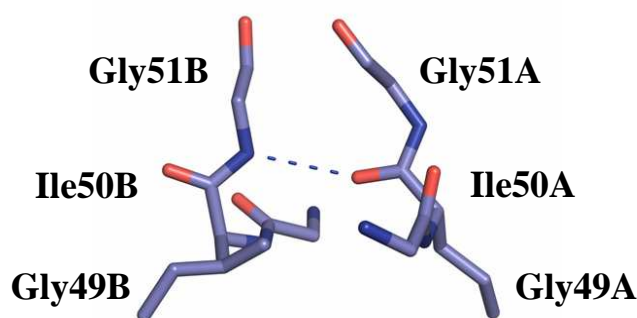


Abbildung 30: Flap-Aminosäuren in der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe

Zusammenfassung und Diskussion

Der Inhibitor KeLi 033 mit einem sekundären Amin als Grundstruktur konnte im Komplex mit der HIV-1 Protease in zwei verschiedenen Raumgruppen kristallisiert werden. Wie schon vergleichsweise in Kapitel 2.3.1 beschrieben, ist der Bindungsmodus in den jeweiligen Strukturen verschieden. Im Unterschied zu dem zuvor beschriebenen Beispiel ergeben sich hier jedoch im Bindungsmodus verhältnismäßig kleine Unterschiede, die insbesondere die Symmetrie betreffen. Die Interaktion der Sulfonamidgruppen mit den Aminosäuren der Flap-Region und die Wechselwirkung mit den katalytischen Aspartaten erfolgen in der Struktur der hexagonalen Raumgruppe symmetrisch, in der orthorhombischen Raumgruppe dagegen asymmetrisch. Daraus folgt auch eine unterschiedliche Position des zentralen Wassermoleküls, das die Interaktionen mit der Flap vermittelt.

In der Proteindatenbank finden sich Hunderte von Strukturen der HIV-1 Protease, als Apoprotein oder im Komplex mit peptidischen und nicht-peptidischen Inhibitoren und Substraten. Eine Suche nach diesen Strukturen in der PDB im April 2011 anhand der E.C.-Nummer 3.4.23.16, die der HIV-1 Protease zugeordnet wird, ergab nach manueller Ergänzung bzw. Entfernung von Strukturen 331 Treffer. Davon konnten allein 227 Strukturen den orthorhombischen Raumgruppen $P2_12_12$ und $P2_12_12_1$ zugeordnet werden. 76 Strukturen wiesen eine hexagonale Raumgruppe auf, in neun dieser Strukturen wurde das Protein als Monomer in der Raumgruppe $P6_122$ verfeinert. In den Strukturen des Apoproteins, die sich meist durch die geöffnete Flap von den Komplexstrukturen unterscheiden, besteht die asymmetrische Einheit zumeist aus einem Monomer der HIV-1 Protease. Ohne Ligand kristallisierte das Protein also zumeist in einer symmetri-

schen Anordnung der beiden Moleküle des aktiven Dimers [81]. In den Komplexstrukturen dagegen weisen die Monomere zumeist eine Abweichung von der Symmetrie zueinander auf, vorwiegend sind auch die – symmetrischen oder asymmetrischen - Liganden asymmetrisch gebunden. Dies passt zu der Erkenntnis, dass die HIV-1 Protease, obwohl ein symmetrisches Protein, asymmetrische Substrate bevorzugt [82]. Nicht umsonst sind wohl auch alle zugelassenen Inhibitoren der HIV-1 Protease asymmetrisch bindende Moleküle. Es stellt sich auch die Frage, ob es im Hinblick auf eine Resistenzbildung durch Punktmutationen sinnvoller ist, asymmetrische Inhibitoren den symmetrischen vorzuziehen. Beim Vorliegen einer Punktmutation, die ja immer beide Moleküle des Dimers betrifft, scheint die Wahrscheinlichkeit, dass ein asymmetrischer Inhibitor diese Herausforderung kompensieren kann, größer zu sein [83].

Die hier beobachtete, eher geringe Abweichung des Bindungsmodus im Zusammenhang mit der Symmetrie ist im biologisch relevanten Zustand in der Lösung vermutlich von geringerer Bedeutung als die in Kapitel 2.3.1 beschriebene, aber insbesondere von kristallographischem Interesse und soll diesbezüglich hier näher diskutiert werden.

Wie kommt es zu diesem Zusammenhang zwischen Bindungsmodus des Inhibitors, Symmetrie und Raumgruppe? Bindet zunächst der Inhibitor auf eine bestimmte Weise an das Protein, beeinflusst damit dessen Konformation und daraus folgend die Anordnung der Proteinmoleküle im Kristall? Oder nehmen die zuvor inhibierten Proteinmoleküle in der Lösung eine bestimmte Anordnung zueinander ein und geben so die Konformation des Proteins und damit den Bindungsmodus des Inhibitors vor?

Wie zuvor beschrieben, ist die Konformation der Flap-Aminosäuren in den beiden Strukturen mit unterschiedlicher Raumgruppe verschieden, was im Zusammenhang mit der Bindung des Inhibitors an diese steht. Gibt es eine Wechselwirkung zwischen den symmetrieäquivalenten Molekülen im Kristall, die den Unterschied in der Konformation bedingt oder erklärt? Die nachfolgenden Abbildungen sollen zunächst einmal die Anordnung der einzelnen HIV-1 Protease Moleküle im Kristall zeigen. In der hexagonalen Raumgruppe interagiert der Flap-Bereich eines HIV-1 Protease Dimers mit der Flap-Region der benachbarten Moleküle. Das zentrale HIV-1 Protease Dimer ist in Abbildung 31 in orange dargestellt, die symmetrieäquivalenten Moleküle, die Interaktionen mit der Flap eingehen, in dunkelrot. Die Flap-Region jedes Moleküls ist jeweils in gold dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, ist der Flap-Bereich eines jeden Monomers in einer Art *Sandwich* von der jeweils anderen Flap-Region des Dimer bildenden Moleküls sowie einer Flap von einem symmetrieäquivalenten Molekül umgeben.

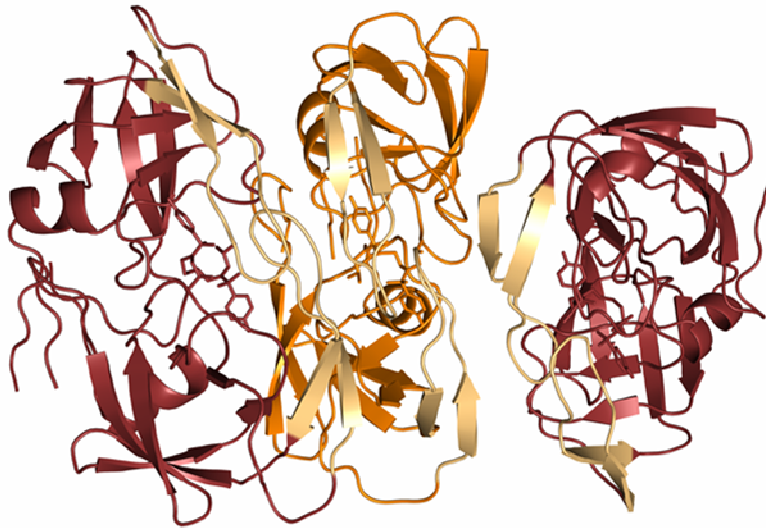


Abbildung 31: Packung der Moleküle im Kristall in der hexagonalen Raumgruppe

In der orthorhombischen Raumgruppe dagegen besteht keine direkte Interaktion der Flap-Bereiche der einzelnen Dimermoleküle im Kristallverbund. Abbildung 32 zeigt ein zentrales HIV-1 Protease Molekül in türkis, die die Flap umgebenden Moleküle sind in blau dargestellt. Die Flap-Bereiche sind wiederum in gold markiert.

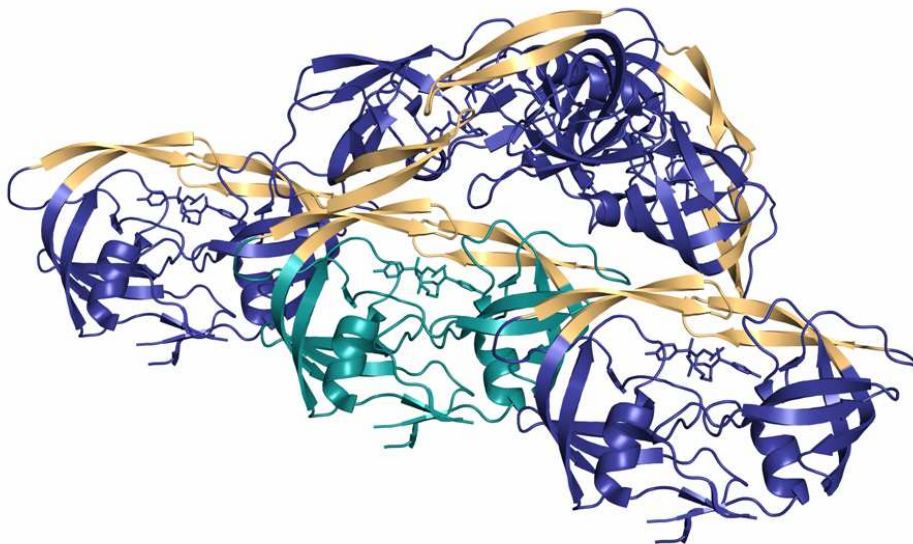


Abbildung 32: Packung der Moleküle im Kristall in der orthorhombischen Raumgruppe

Durch die unterschiedliche Anordnung der HIV-1 Protease Moleküle im Kristall zueinander unterscheiden sich natürlich auch die Wechselwirkungen, die das Protein zum jeweiligen symmetrieäquivalenten Molekül in den beiden Raumgruppen eingeht. Abbildung 33 zeigt die in der hexagonalen Raumgruppe bestehenden hydrophoben Interakti-

onen zwischen der Aminosäure Phe53 mit eben dieser des Symmetrieäquivalents. Die Flap-Aminosäuren 42 bis 58 der beiden Ketten des zu betrachtenden Dimermoleküls sind grau dargestellt, die des jeweiligen Symmetrieäquivalents in dunkelrot. Wie die Abbildung zeigt, liegt die Aminosäure jeweils in zwei Konformationen vor, die beide zu 50% verfeinert wurden und die jeweilige Konformation im symmetrieäquivalenten Molekül bedingen.

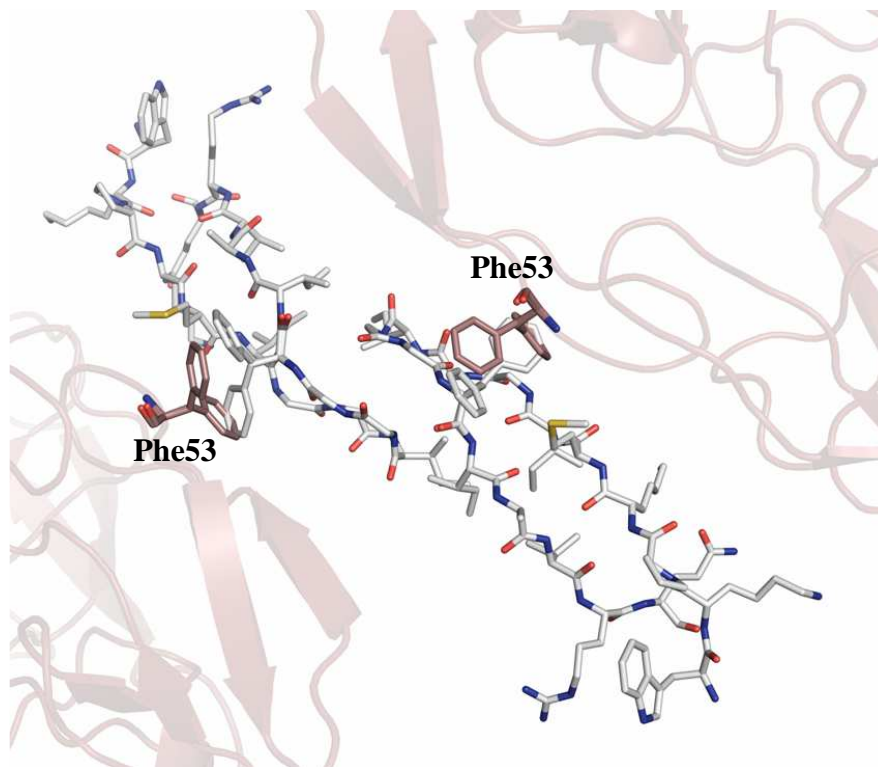


Abbildung 33: Interaktionen der Flap-Region (grau) mit symmetrieäquivalenten Molekülen in der hexagonalen Raumgruppe (rot)

In der orthorhombischen Raumgruppe sind die Wechselwirkungen dieser Flap-Aminosäuren, dargestellt in grau, mit den symmetrieäquivalenten Molekülen, dargestellt in blau, ausgeprägter, wie Abbildung 34 zeigt. Die Aminosäure Gln61B eines symmetrieäquivalenten Moleküls geht Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonylsauerstoff des Rückgrats von Pro44A sowie zur Seitenkette von Gln58A ein. Pro44A bildet weiterhin hydrophobe Interaktionen zu den Aminosäuren Leu63B und Ile72B des Symmetrieäquivalents aus. Der Amidstickstoff des Rückgrats der Aminosäure Met46A interagiert über ein Wassermolekül mit dem Carbonylsauerstoff des Rückgrats von Ala71B im symmetrieäquivalenten Molekül. In dieser Struktur liegt nur eine Konformation der Aminosäure Phe53A vor, die van der Waals-Wechselwirkungen mit Trp6A und Gln92B des Nachbarmoleküls ausbildet. Die Flap-Region der B-Kette des betrachteten

Moleküls bildet hydrophobe Interaktionen zwischen Trp42B und Pro44B zu der Aminosäure Trp6B eines weiteren Symmetrieäquivalents aus. Der Carbonylsauerstoff des Trp42B geht außerdem eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von Gln92A dieses symmetrieäquivalenten Moleküls ein.

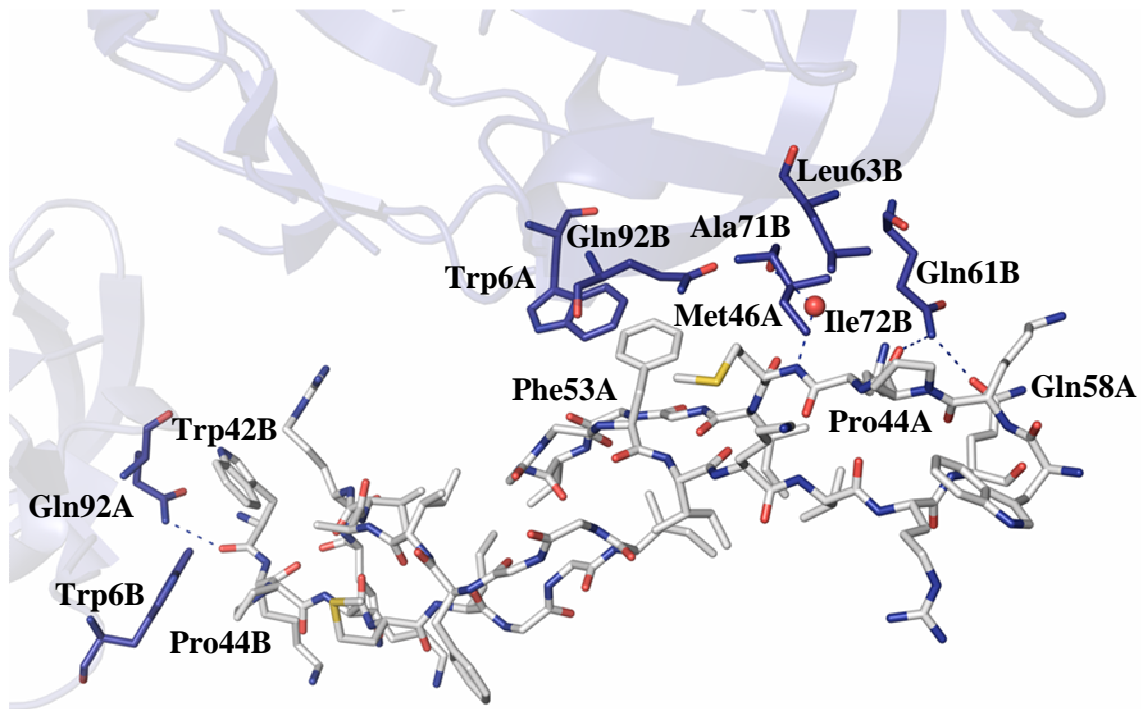


Abbildung 34: Interaktionen der Flap-Region (grau) mit symmetrieäquivalenten Molekülen in der orthorhombischen Raumgruppe (blau)

Die beschriebenen Wechselwirkungen, die die Flap-Regionen der HIV-1 Protease in den beiden Raumgruppen eingehen, stehen, so weit ersichtlich, nicht im Zusammenhang mit den in den Abbildungen 29 und 30 gezeigten, verschiedenen Konformationen des Dipeptids Ile50-Gly51. Auch eine Überlagerung der Flap-Regionen der beiden Strukturen ergab keinen Anhaltspunkt, warum die zwischen den Symmetrieäquivalenten ausgebildeten Wechselwirkungen nur in der jeweils vorliegenden Konformation möglich sein sollten. Eine Berechnung der RMSD-Werte der Strukturen pro Aminosäure sollte Aufschluss darüber geben, ob die Abweichung der Positionen der C α -Atome in der Flap-Region im Verhältnis zum verbleibenden Protein größer ist oder nicht. Die nachfolgenden Diagramme zeigen die RMSD-Werte zwischen der Struktur der hexagonalen Raumgruppe und den beiden Ketten der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe.

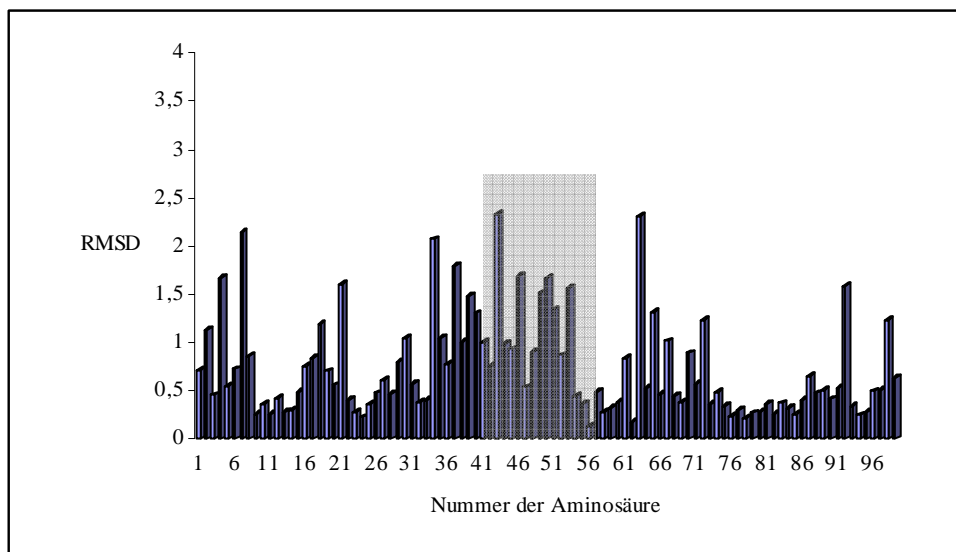


Abbildung 35: RMSD-Werte [Å] zwischen der Struktur der hexagonalen Raumgruppe und der Kette A der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe

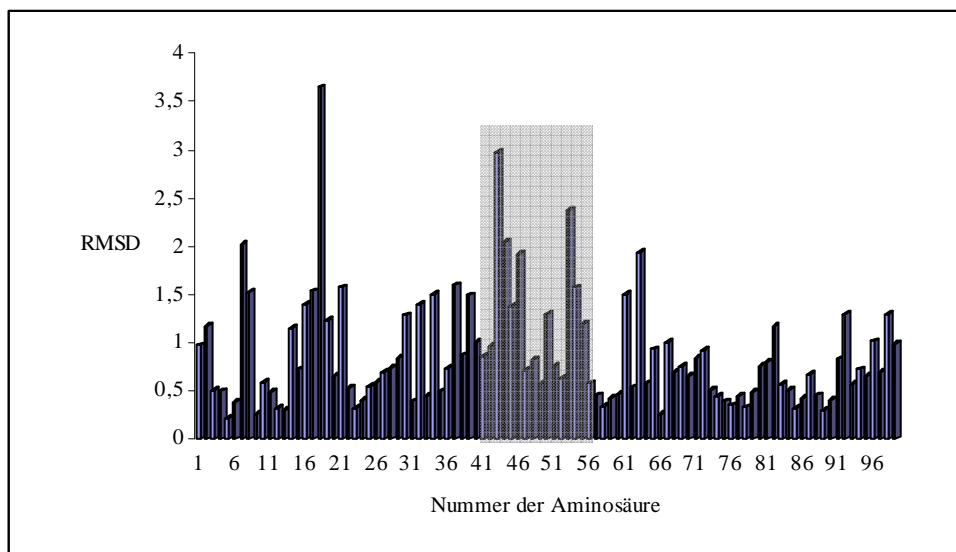


Abbildung 36: RMSD-Werte [Å] zwischen der Struktur der hexagonalen Raumgruppe und der Kette B der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe

Der Gesamt-RMSD zwischen der Struktur der hexagonalen Raumgruppe und der Kette A der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe wurde zu 0.92\AA berechnet. Im Bereich der Flap-Aminosäuren 42 bis 58 beträgt der RMSD 0.97\AA . Die Berechnung des Vergleiches mit der Kette B der Struktur der orthorhombischen Raumgruppe ergab einen RMSD von 1.09\AA für das gesamte Protein und 1.21\AA für die Aminosäuren der Flap. Die RMSD-Werte sind jeweils im Bereich der Flap etwas höher als für das gesam-

te Protein, wie auch in den oben dargestellten Diagrammen zu erkennen ist. Der Flap-Bereich ist hier jeweils grau hinterlegt.

Auch wenn die Untersuchung der Wechselwirkungen im Detail keine Interaktion oder Konformation als Ursache oder Folge der Symmetrie und der Kristallpackung erkennen lässt, ist doch anhand der hier gezeigten Daten deutlich geworden, dass die Flap-Bereiche der jeweiligen HIV-1 Protease Moleküle diesbezüglich von großer Bedeutung sind. Vermutlich gibt es keine gezielte Interaktion, zum Beispiel in Form einer Wasserstoffbrückenbindung, zwischen den Symmetrieäquivalenten, die für die Anordnung der Moleküle im Kristall verantwortlich ist. Vielmehr ist es der generelle *Shape* der Moleküle, insbesondere in den Flap-Regionen, der sich in den verschiedenen Raumgruppen unterscheidet, wie vor allem die *Sandwich*-Anordnung in der hexagonalen Raumgruppe vermuten lässt. Ein ähnliches Phänomen ist in der Literatur über die Substratspezifität der HIV-1 Protease beschrieben [84]: Es lässt sich kein generelles Muster in der Anordnung der Aminosäuren in den Substratpeptiden beschreiben, die dreidimensionale (asymmetrische) Gestalt, die diese ausbilden, scheint entscheidend zu sein.

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich nicht abschließend klären, welcher Zusammenhang hinter dem beobachteten Phänomen der Kristallisation in zwei Raumgruppen und der Symmetrie von Protein und Inhibitor steht. Weitere kristallographische Untersuchungen von HIV-1 Protease Komplexen mit verschiedenen symmetrischen und nicht symmetrischen Inhibitoren können vielleicht eines Tages Licht ins Dunkel bringen.

2.3.3 Kationische C₆₀-Fullerene als Inhibitoren der HIV-1 Protease

Einleitung

Fullerene sind sphärische Moleküle aus Kohlenstoffatomen. Das Fulleren mit der Summenformel C₆₀, das auch als Buckminsterfulleren bezeichnet wird, wurde erstmals 1985 chemisch synthetisiert [85], kommt jedoch auch natürlich vor. Seit seiner Entdeckung wird die Verwendung des C₆₀-Fullerens in vielen Gebieten der biologischen Chemie und der Materialwissenschaften erforscht. Von medizinischem Interesse ist unter anderem die in der Literatur beschriebene Wirksamkeit von C₆₀-Derivaten als Antioxidantien, Neuroprotektiva und Antiapoptotika. Auch die Inhibition verschiedener Enzyme durch C₆₀-Fullerene konnte gezeigt werden [86]. Im Jahr 1993 wurde dann die erste Studie veröffentlicht, in der C₆₀-Fullerene auch als Inhibitoren der HIV-1 Protease charakterisiert wurden [87].

Die Bindetasche der HIV-1 Protease kann als ein an den Enden geöffneter Zylinder betrachtet werden, mit vornehmlich hydrophoben Eigenschaften. Eine gewisse Komplementarität zu dem hydrophoben sphärischen C₆₀-Fulleren mit einem van-der-Waals-Durchmesser von ca. 10Å, ähnlich dem Durchmesser der Bindetasche der HIV-1 Protease, wurde postuliert. Seitdem wurden zahlreiche C₆₀-Derivate auf ihre Bindungsaffinität zur HIV-1 Protease überprüft und mögliche Bindungsmodi mittels computerchemischer Methoden vorgestellt [88-91]. Bisher gelang es jedoch nicht, eine Kristallstruktur der HIV-1 Protease im Komplex mit einem Fulleren-Derivat zu bestimmen.

In diesem Kapitel sollen drei neue C₆₀-Fulleren-Derivate als Inhibitoren der HIV-1 Protease vorgestellt werden. Die drei Verbindungen weisen kationische Eigenschaften durch zwei positiv geladene Substituenten auf, deren relative Position zueinander als trans-2 bezeichnet wird. Positive Ladungen nah am C₆₀-Molekül und diese relative Position der Substituenten haben sich als vorteilhaft für die Aktivität gegenüber dem HI Virus erwiesen [88].

Die kationischen Eigenschaften der Verbindungen verbessern außerdem die Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln, die bei Fullerenen meist ein Problem darstellt. Die Löslichkeit der Inhibitoren ist ein wichtiger Aspekt bei der Co-Kristallisation im Komplex mit Proteinen und auch bei Überlegungen zum späteren Einsatz als Wirkstoff in der Medizin.

Ergebnisse

Kinetik

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Strukturformeln der drei C₆₀-Fulleren-Derivate. Der C₆₀-Fulleren Grundkörper wurde mit Pyrrolidinringen, die in trans-2 Position zueinander stehen, disubstituiert. Die Stickstoffe der Pyrrolidinringe sind positiv geladen und teilweise mit weiteren kationischen Substituenten verknüpft.

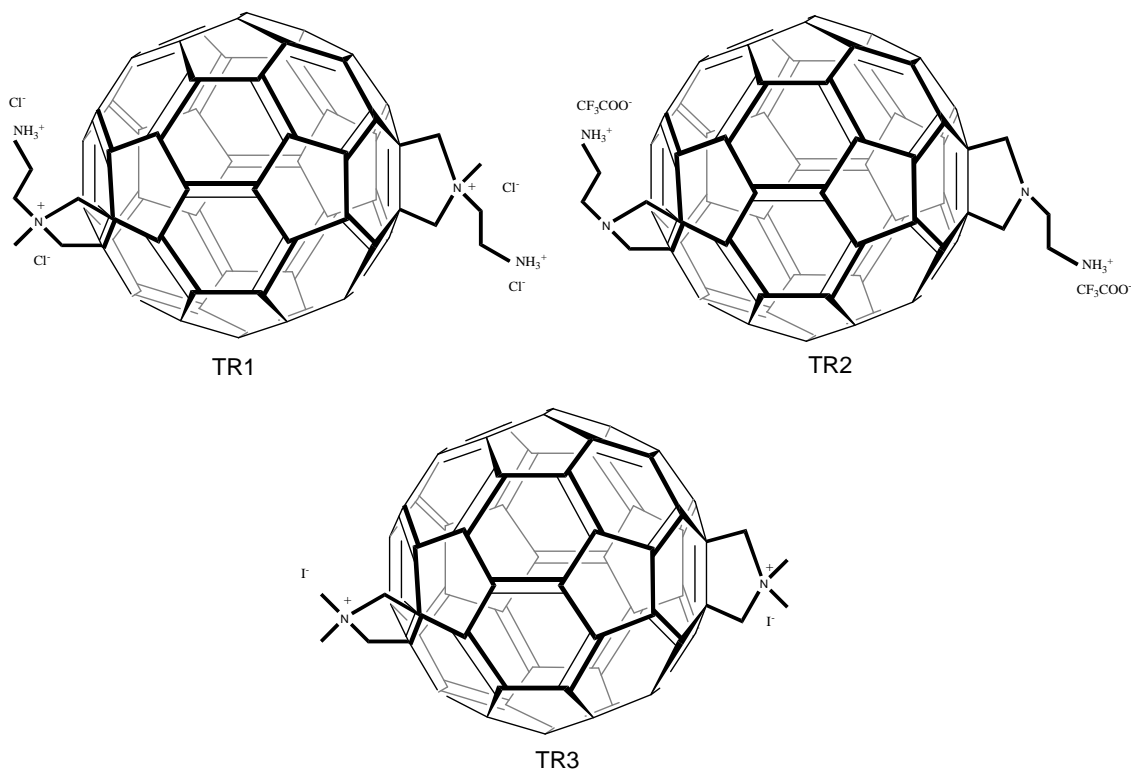


Abbildung 37: Strukturformeln der C₆₀-Fulleren-Inhibitoren TR 1 - TR3

Fullerene aggregieren aufgrund ihrer Hydrophobizität leicht in einer hydrophilen Umgebung. Eine unspezifische Inhibition durch Aggregatbildung, eine sogenannte promiske Inhibition, musste daher vor der Bestimmung der K_i-Werte im Enzymassay ausgeschlossen werden. Dies ist möglich durch die Verwendung von Detergentien, die die Aggregatbildung verhindern [55].

Zwei verschiedene Detergentien, Tween 20 und Triton X-100, wurden zunächst im Assay getestet, um einen Einfluss auf die Enzymaktivität auszuschließen. Es wurden jeweils fünf verschiedene Konzentrationen zwischen 0,0001% und 1% eingesetzt: Nach Durchführung eines Ausreißertests wurden die Standardabweichungen der Messreihen, bei denen Detergentien eingesetzt wurden, mit der Standardabweichung einer Messreihe ohne Detergens im statistischen F-Test verglichen. Die Standardabweichungen waren in

keinem Fall signifikant verschieden. Dies bedeutet, dass beide Detergentien im getesteten Konzentrationsbereich im Enzymassay eingesetzt werden können.

Jedoch war unklar, welche Konzentration des Detergens erforderlich ist, um eine unspezifische Inhibition zu verhindern. Eine Studie zur Identifikation promisker Inhibitoren unter bekannten Wirkstoffen hatte ergeben, dass unter anderem der antimykotische Wirkstoff Clotrimazol ein solch unspezifischer Inhibitor ist [56]. Würde nun dieser Effekt des Clotrimazols auch im Assay der HIV-1 Protease auftreten, hätte die erforderliche Detergenskonzentration zur Verhinderung der Aggregatbildung getestet werden können. Darauf folgend wurde Clotrimazol im Assay in Konzentrationen zwischen 1 mM und 100 μ M eingesetzt. Jedoch konnte keine Inhibition der HIV-1 Protease festgestellt werden.

Die Messungen zur Bestimmung der K_i -Werte wurden jeweils in Anwesenheit und in Abwesenheit eines Detergens durchgeführt. Als Detergens wurde Tween 20 in einer Konzentration von 0,1% verwendet, eine höhere Konzentration als in vergleichbaren Experimenten [57] und daher vermutlich ausreichend hoch. Die C_{60} -Fullerene konnten jeweils in einer Konzentration von 50 mM in DMSO gelöst werden. Die Lösung war braun gefärbt, wies aber keine sichtbaren Feststoffpartikel auf. Um eine Präzipitation bei dem Vermischen mit dem Substrat-Puffer-Gemisch in der Assayplatte zu verhindern, musste jedoch der Gehalt an DMSO im Gesamtansatz auf 10% erhöht werden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Bezeichnung des Inhibitors	K_i [μ M] mit Detergens	K_i [μ M] ohne Detergens
TR 1	30,6	34,3
TR 2	28,8	72,3
TR 3	11,1	63,2

Tabelle 6: K_i -Werte der C_{60} -Fulleren-Inhibitoren

Wie man erkennen kann, ist die Affinität der Inhibitoren zu der HIV-1 Protease in Anwesenheit eines Detergens jeweils höher als in dessen Abwesenheit, signifikant im Fall der Inhibitoren TR 2 und TR 3. Eine unspezifische Inhibition, bei der die Affinität zum Protein in Anwesenheit eines Detergens vermindert wäre, kann somit ausgeschlossen werden. Vermutlich findet jedoch trotzdem in Lösung eine Aggregatbildung der Inhibi-

toren statt, die hier nicht zu einer unspezifischen Inhibition führt, aber durch das Detergens vermindert wird und daher die erhöhte Affinität zum Protein in dessen Anwesenheit erklärt.

Co-Kristallisation der Inhibitoren mit der HIV-1 Protease

Nachdem eine unspezifische Inhibition der HIV-1 Protease durch die Inhibitoren ausgeschlossen werden konnte, wurden diese zur Co-Kristallisation der HIV-1 Protease angesetzt. Aufgrund der eher schwachen Bindungsaffinität der Inhibitoren, insbesondere von TR 1 und TR 2, wurden diese in möglichst hohen Konzentrationen eingesetzt. Die maximale Konzentration, die dabei jeweils verwendet wurde, betrug 2,5 mM, limitiert durch eine für erfolgreiches Kristallwachstum der HIV-1 Protease maximal mögliche DMSO-Konzentration von 10%. Auch nach einem *Streak-Seeding* konnte jedoch in keinem der Kristallisationsansätze Kristallwachstum beobachtet werden.

Zusammenfassung und Diskussion

Die Bindungsaffinität dreier kationischer C₆₀-Fulleren-Derivate zur HIV-1 Protease konnte bestimmt werden. Die K_i-Werte liegen im zweistellig mikromolaren Bereich. Durch die Verwendung eines Detergens im Assay konnte auch eine unspezifische Inhibition des Enzyms durch Aggregatbildung der C₆₀-Fullerene ausgeschlossen werden. Dennoch gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die Inhibitoren im Komplex mit der HIV-1 Protease zu kristallisieren.

Für eine erfolgreiche Co-Kristallisation müsste entweder die Affinität der Inhibitoren zur HIV-1 Protease gesteigert oder die Löslichkeit der Verbindungen erhöht werden. Das C₆₀-Fulleren Derivat mit der bisher höchsten bekannten Affinität zur HIV-1 Protease hat einen K_i-Wert von 36 nM [89], inhibiert also das Enzym signifikant besser als die vorliegenden Verbindungen. Computerchemische Methoden wie Docking oder Moleküldynamiksimulationen könnten helfen, die vorliegenden Inhibitoren bezüglich der Substituenten in Art und Position zu optimieren, so lange keine Co-Kristallstruktur als Grundlage für das Design zur Verfügung steht. Dabei sollte eine mögliche Wechselwirkung der kationischen Gruppen mit den katalytischen Aspartaten der HIV-1 Protease berücksichtigt werden.

Eine Einführung weiterer hydrophiler Gruppen könnte die Löslichkeit der Inhibitoren verbessern, so dass diese für eine Co-Kristallisation geeignet wären. Denn auch Inhibitoren mit vergleichbarer Affinität, aber besserer Löslichkeit, wie sie zum Beispiel in

Kapitel 2.3.6 beschrieben sind, kristallisierten bereits im Komplex mit der HIV-1 Protease.

Eine weitere Möglichkeit für eine erfolgreiche Co-Kristallisation wäre die Verwendung von Cyclodextrinen, die hydrophobe Moleküle aufnehmen und ihnen damit Löslichkeit vermitteln können. Die erfolgreiche Aufnahme eines C₇₀-Fullerenmoleküls durch Cyclodextrine wurde bereits in der Literatur beschrieben [92].

Vielleicht wird eines Tages ein Fullerenderivat als Wirkstoff für ein Medikament in Frage kommen. Dann wird es eine technologische Herausforderung sein, herauszufinden, wie ein solches Molekül sinnvoll appliziert werden und sich anschließend im Körper verteilen und seine Wirkung entfalten kann.

2.3.4 Piperidin-Derivate als Inhibitoren der HIV-1 Protease

Einleitung

Im Jahr 1999 wurde eine Studie der Firma Hoffmann-La Roche veröffentlicht, in der Piperidin-Derivate als neue, nicht peptidomimetische Inhibitoren der humanen Aspartylprotease Renin vorgestellt wurden. Mittels strukturbasiertem Design konnte die Affinität der Piperidin-basierten Inhibitoren von Werten im mikromolaren auf Werte im picomolaren Bereich gesteigert werden. Auch eine Inhibition der Aspartylproteasen Plasmepsin I und Plasmepsin II durch Piperidin-Derivate konnte beobachtet werden [47-49].

In dieser Arbeit voraus gegangenen Studien konnten bereits Pyrrolidin- und Oligoamin-Derivate als Inhibitoren der HIV-1 Protease mit einer die katalytischen Aspartate adressierenden Aminofunktionalität etabliert werden [50]. Aufbauend auf diesen Erfahrungen wurden nun Piperidin-Derivate als neues Grundgerüst für das Design von Inhibitoren der HIV-1 Protease ausgewählt. Verschiedene 3,4-disubstituierte Piperidine wurden von Kerstin Linde mit Hilfe von Docking-Methoden entworfen und synthetisiert. Abbildung 38 zeigt beispielhaft einen möglichen Bindungsmodus des Inhibitors KeLi 152.

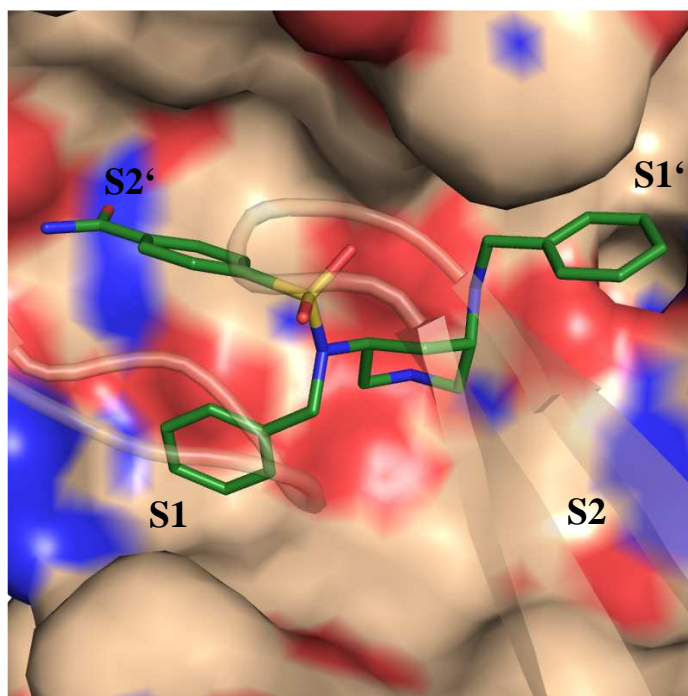


Abbildung 38: Bindungsmodus des Inhibitors KeLi 152 im Docking [93]

Im nachfolgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Co-Kristallisationsansätze und der kinetischen Messungen und die darauffolgenden Variationen des Substitutionsmusters der Inhibitoren vorgestellt.

Ergebnisse

Im Enzymassay und in den Kristallisationsansätzen wurde die HIV-1 Protease Mutante Q7K L33I L63I eingesetzt.

Kinetik

Abbildung 39 zeigt das Grundgerüst der Piperidin-Derivate. Es wurde insbesondere an den Positionen R 1 und R 2 variiert.

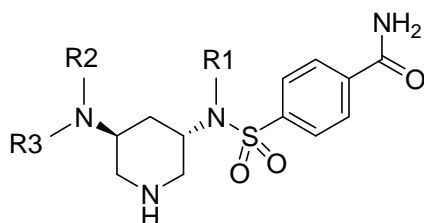
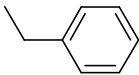
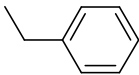
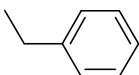
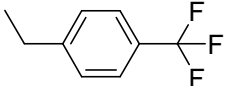
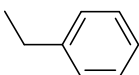
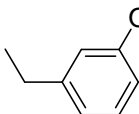
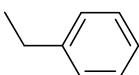
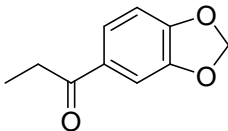
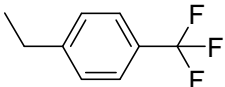
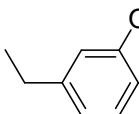
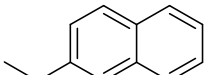
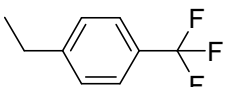
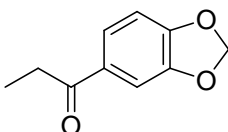
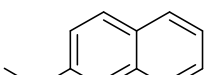
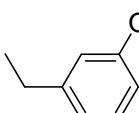
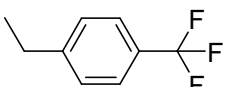
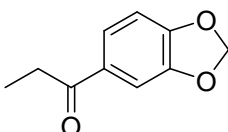
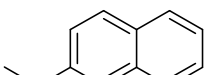
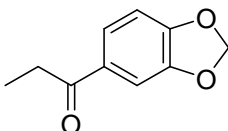


Abbildung 39: Grundgerüst der Piperidin-basierten Inhibitoren

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Messungen der Piperidin-basierten Inhibitoren im Enzymassay aufgeführt. Die fünf Piperidin-Derivate KeLi 152, KeLi 153, KeLi 185, KeLi 190 und KeLi 202 zeigten keine Affinität zu der HIV-1 Protease, während es möglich war, für die vier Inhibitoren KeLi 184, KeLi 187, KeLi 207 und KeLi 208 einen K_i -Wert zu bestimmen. Weiterhin konnte für die sechs Inhibitoren KeLi 154, KeLi 155, KeLi 186, KeLi 188, KeLi 201 und KeLi 205 eine Inhibition der HIV-1 Protease bei einer Inhibitorkonzentration von 500 μ M festgestellt werden, die in der Tabelle als prozentuale Inhibition ausgedrückt wird. Die Bestimmung eines K_i -Wertes war jedoch aufgrund der geringen Affinität dieser Inhibitoren nicht möglich.

Bezeichnung des Inhibitors	R 1	R 2	R 3	K _i [μM]	% Inhibition bei 500 μM
KeLi 152			—H	k. I.	
KeLi 153			—H	k. I.	
KeLi 154			—H		67,5
KeLi 155			—H		82,2
KeLi 184			—H	23,5	
KeLi 185		—CH ₃	—CH ₃	k. I.	
KeLi 186			—CH ₃		32,8
KeLi 187			—H	20,6	
KeLi 188			—H		54,1
KeLi 190			—CH ₃	k. I.	

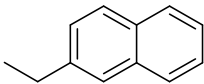
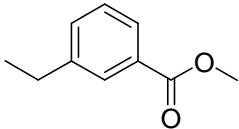
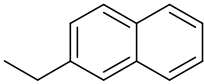
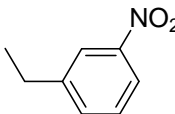
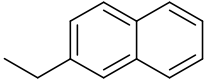
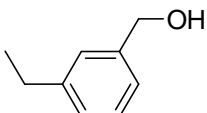
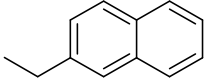
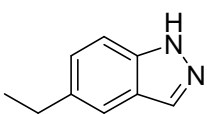
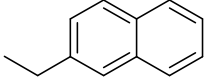
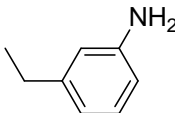
KeLi 201			—H		46,3
KeLi 202			—H	k. I.	
KeLi 205			—H		78,3
KeLi 207			—H	8,7	
KeLi 208			—H	32,7	

Tabelle 7: Ergebnisse der Messungen der Piperidin-basierten Inhibitoren im Enzymassay

Co-Kristallisation der Inhibitoren mit der HIV-1 Protease

Die Inhibitoren KeLi 184, KeLi 187, KeLi 207 und KeLi 208, die die höchste Affinität im Assay zeigen konnten, wurden mit der HIV-1 Protease zur Kristallisation angesetzt. In dem Ansatz, in dem der Inhibitor KeLi 184 verwendet wurde, wuchs ein kleiner, dünner, plättchenförmiger Kristall. Dieser konnte für eine Datensammlung verwendet werden. In den weiteren Ansätzen konnte auch nach *Streak-Seeding* kein Kristallwachstum beobachtet werden. In den Ansätzen mit den Inhibitoren KeLi 207 und KeLi 208 fiel das Protein als braunes Präzipitat aus.

Datensammlung und Strukturverfeinerung

Von dem oben erwähnten Kristall aus den Kristallisationsansätzen mit dem Inhibitor KeLi 184 konnte an der Beamline 14.2 des Synchrotrons BESSY II ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.98 Å gesammelt werden. Aufgrund der geringen Streufähigkeit des Kristalls, vermutlich bedingt durch seine geringe Größe und mangelnde Dreidimensionalität, musste für die Datensammlung eine verhältnismäßig hohe Belichtungszeit von 20 s verwendet werden. Die Kristallstruktur wurde nach Prozessierung der Daten

und Molekularem Ersatz für einige Zyklen verfeinert. Jedoch konnte die in der Bindetasche zu beobachtende Differenzelektronendichte weder der Struktur des Inhibitors noch anderen Molekülen zugeordnet werden. Somit erfolgte keine weitere Bearbeitung dieser Kristallstruktur.

Zusammenfassung und Diskussion

Nach Studien mit der humanen Aspartylprotease Renin konnte hier gezeigt werden, dass Piperidin-Derivate ebenfalls Inhibitoren der HIV-1 Protease sein können. Durch Variation der Substituenten der Piperidin-Derivate, unterstützt durch Docking, gelang es, die Inhibition auf einen einstellig mikromolaren Wert zu verbessern. Bisher war es jedoch nicht möglich, die HIV-1 Protease im Komplex mit einem Piperidin-basierten Inhibitor zu kristallisieren und eine Co-Kristallstruktur zu bestimmen. Die beobachtete Präzipitation in den Kristallisationsansätzen mit den Inhibitoren KeLi 207 und KeLi 208 gibt Rätsel auf. Ein ähnliches Phänomen konnte in Kristallisationsansätzen eben dieser Inhibitoren mit der Aspartylprotease Endothiapepsin in der Arbeitsgruppe beobachtet werden. Eine Möglichkeit wäre, die Kristallisationsbedingungen weiter zu variieren und alternative Kristallisationsbedingungen zu testen, die für Komplexe der HIV-1 Protease Mutante Q7K L33I L63I bekannt sind [94]. Vielleicht ist es möglich, eine Proteinpräzipitation durch veränderte Bedingungen zu verhindern oder zu reduzieren.

Wie die Ergebnisse der kinetischen Messungen zeigen, scheint in Position R 1 der Inhibitoren eine Präferenz für größere hydrophobe Substituenten vorhanden zu sein. Dieser Rest soll nach den Docking-Ergebnissen die S1-Tasche der HIV-1 Protease adressieren. Die Inhibitoren KeLi 152, KeLi 153, KeLi 154 und KeLi 155, die dort einen Benzylrest tragen, zeigten keine oder eine schwache Inhibition der HIV-1 Protease im Assay. Im Falle der Inhibitoren KeLi 184 und KeLi 187, die in dieser Position einen Trifluorbenzyl- bzw. einen Naphthylrest tragen, konnte eine Inhibition im zweistellig mikromolaren Bereich gemessen werden. Diese beiden Inhibitoren sind in Position R 2 mit einem in meta-Stellung hydroxysubstituierten Benzylrest besetzt, der, dem Docking nach zu urteilen, die S1'-Tasche des Proteins adressieren sollte. Dieser scheint nicht ohne weiteres austauschbar zu sein, wie am Beispiel der Inhibitoren KeLi 186, KeLi 188, KeLi 190, KeLi 201, KeLi 202 und KeLi 205 zu sehen ist. Schon kleine Variationen, wie die Erweiterung zu einer Hydroxymethylgruppe bei KeLi 205, führen hier zu einer geringeren Affinität. Mit einem Indazolrest in dieser Position zeigt KeLi 208 mit einem K_i -Wert von 8,7 μM die bisher beste Inhibition der HIV-1 Protease unter den Piperidin-

Derivaten. Um so unbefriedigender, dass kein Kristallwachstum unter den verwendeten Kristallisationsansätzen erfolgte – dies konnte bei einem Einsatz von Inhibitoren mit vergleichbarer Affinität in anderen Fällen durchaus beobachtet werden.

Für eine weitere Optimierung der Piperidin-Derivate wäre eine Co-Kristallstruktur mit der HIV-1 Protease dringend erforderlich, um den mittels Docking hypothetisierten Bindungsmodus zu überprüfen und um neue Ideen für das Design zu gewinnen.

2.3.5 Dreiarmlige Pyrrolidine als Inhibitoren der HIV-1 Protease

Einleitung

Symmetrische Pyrrolidin-Derivate wurden bereits in vorangegangenen Studien als Inhibitoren der HIV-1 Protease etabliert. Mehrere Zyklen strukturbasierter Designs führten zu einer Verbesserung der K_i -Werte der Inhibitoren vom zweistellig mikromolaren zum zweistellig nanomolaren Bereich. Das Substitutionsmuster der Pyrrolidine wurde anhand von Beobachtungen der Wechselwirkungen in Kristallstrukturen optimiert, so dass der Inhibitor AB 111 mit der höchsten Affinität nun einen K_i -Wert von 74 nM aufweist [64].

In den Kristallstrukturen der in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12$ kristallisierten Komplexe konnte beobachtet werden, dass die Inhibitoren einen unsymmetrischen Bindungsmodus aufweisen, wie Abbildung 40 zeigt.

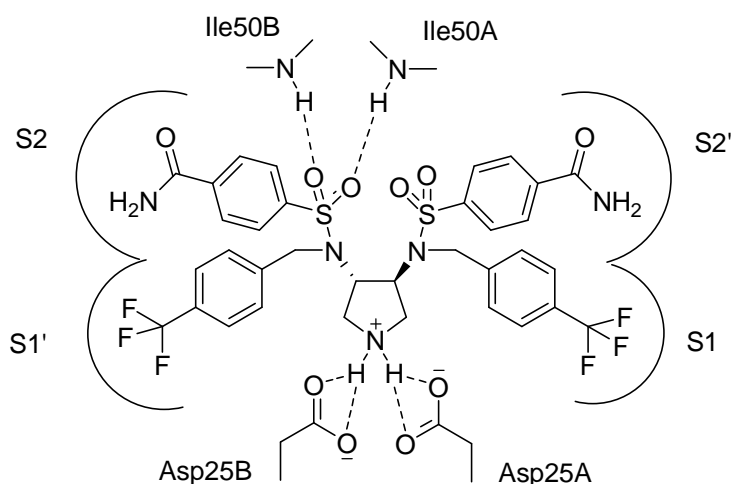


Abbildung 40: Asymmetrischer Bindungsmodus des Inhibitors AB 111

In diesem Kapitel soll gezeigt werden, wie auf der Grundlage dieser Beobachtungen unsymmetrische Pyrrolidin-Derivate als Inhibitoren der HIV-1 Protease entwickelt wurden. Das Ziel war, die Taschen der HIV-1 Protease durch die Aufhebung der Symmetrie gezielter zu adressieren. Weiterhin sollten für die Wechselwirkungen des Inhibitors zum Protein nicht erforderliche Gruppen entfernt und somit das Molekulargewicht der Inhibitoren reduziert werden, um den Arzneistoffcharakter der Inhibitoren zu erhöhen. Die Inhibitoren wurden von Nina Klee mit Hilfe von Docking-Methoden entwor-

fen und synthetisiert. Nach Affinitätsbestimmung und Co-Kristallisation mit der HIV-1 Protease konnten neue Erkenntnisse in den nächsten Designzyklus einbezogen werden.

Ergebnisse

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der Inhibitoren sowie für die Co-Kristallisation wurde die HIV-1 Protease Mutante Q7K L33I L63I verwendet. Abbildung 41 zeigt das Grundgerüst der dreiarmligen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren.

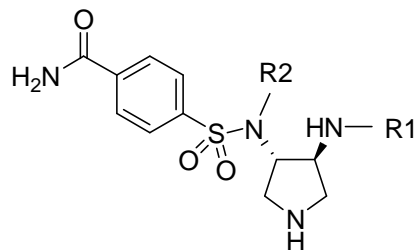


Abbildung 41: Grundgerüst der Pyrrolidin-basierten Inhibitoren

Kinetik

Die K_i -Werte der entsprechend substituierten Verbindungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

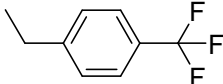
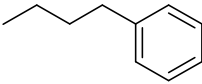
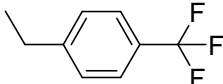
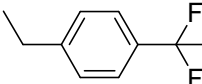
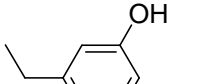
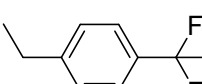
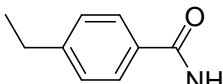
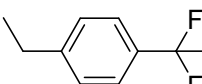
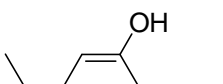

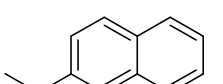
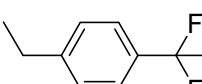
Bezeichnung des Inhibi- tors	R 1	R 2	K_i [μ M]
NK 81			5,6
NK 82			2,1
NK 83			0,32
NK 88			1,6
NK 93.1			0,42
NK 93.2			20,2

Tabelle 8: K_i -Werte der Pyrrolidin-basierten Inhibitoren

Es wurden insbesondere die Substituenten in Position R 1 des Grundgerüsts variiert. In Position R 2 ist, mit Ausnahme des Inhibitors NK 81, der einen 3-Phenylpropylrest trägt, eine *p*-Trifluormethylbenzylgruppe vorhanden.

Co-Kristallisation der Inhibitoren mit der HIV-1 Protease

Die Inhibitoren NK 81, NK 82, NK 83, NK 88 und NK 93.1, deren Affinität zum Protein im Assay gezeigt werden konnte, wurden mit der HIV-1 Protease zur Kristallisation

angesetzt. In den Kristallisationsansätzen mit den Inhibitoren NK 83, NK 88 und NK 93.1 wuchsen spontan plättchenförmige Kristalle. Nach *Streak-Seeding* kam es auch in den Ansätzen mit den Inhibitoren NK 81 und NK 82 zu einem Kristallwachstum. Die Kristalle waren häufig sehr klein und stark miteinander verwachsen. Eine Reduzierung der Präzipitanskonzentration und die Durchführung der Kristallisationsansätze im Kühlraum bei 5°C führte zum Wachstum von größeren Kristallen, die weniger stark verwachsen waren. Diese Kristalle konnten mit Hilfe der zum Montieren verwendeten Schleife voneinander getrennt und so für eine Datensammlung verwendet werden.

Datensammlung und Strukturverfeinerung

Mit Hilfe von Synchrotronstrahlung konnten am Synchrotron BESSY II Datensätze von Komplexen mit allen zuvor erwähnten Inhibitoren gesammelt werden. Die Auflösung der Datensätze liegt zwischen 1.45Å und 1.73Å . Tabelle 9 zeigt die kristallographischen Parameter, die die Daten und die Auswertung beschreiben. Jedem Datensatz konnte die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12$ zugeordnet werden, in der die asymmetrische Einheit ein HIV-1 Protease Dimer enthält.

Bei der Datensammlung des Komplexes der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 88 kam es durch Vereisungen am Kristall zum Auftreten eines sogenannten Eisringes. Dieser störte die Auswertung der Reflexe in dem betreffenden Auflösungsbereich. Im Bereich von 2.00Å bis 1.89Å ist somit die Vollständigkeit der Daten auf 68,0% reduziert und die dazugehörigen R-Faktoren verhältnismäßig hoch. Dies erklärt, warum der R-Faktor sowie der freie R-Faktor der gesamten Struktur im Verhältnis zu den anderen Strukturen höher ist.

Die Koordinaten der fünf Strukturen wurden in der Proteindatenbank unter den Codes 3QBF, 3QRM, 3QPJ, 3QRS und 3QRO hinterlegt.

Bezeichnung der Struktur	HIV-1 PR – NK 81	HIV-1 PR – NK 82	HIV-1 PR – NK 83	HIV-1 PR – NK 88	HIV-1 PR – NK 93.1
Datensammlung und Prozessierung					
Wellenlänge [Å]	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszellparameter [Å;°]	a = 58.2, b = 86.1 , c = 46.5; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$	a = 57.9, b = 86.0, c = 46.5; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$	a = 57.9, b = 86.0, c = 46.3; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$	a = 57.9, b = 86.2, c = 46.5; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$	a = 57.4, b = 86.3, c = 46.2; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$
Auflösungsbereich [Å]	30.00-1.45 (1.48-1.45)	30.00-1.73 (1.76-1.73)	30.00-1.61 (1.64-1.61)	50.00-1.59 (1.63-1.59)	30.00-1.62 (1.65-1.62)
Anzahl einzigartiger Reflexe	41616 (1989)	24130 (1150)	30793 (1493)	30476 (2117)	29643 (1251)
R _{sym} [%]	6.2 (28.6)	4.4 (19.0)	10.0 (28.6)	5.2 (17.8)	6.1 (35.7)
Vollständigkeit [%]	98.5 (95.9)	96.8 (93.6)	99.9 (99.3)	94.7 (99.4)	98.5 (83.8)
Redundanz	4.5 (4.2)	3.6 (3.6)	6.4 (7.0)	3.1 (3.1)	5.1 (2.6)
I / σ	23.2 (4.8)	28.8 (6.0)	18.5 (6.1)	21.0 (6.0)	25.5 (2.9)
Matthews-Koeffizient [Å ³ /Da]	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
Lösungsmittelgehalt [%]	54.4	54.1	53.9	54.2	53.6

	HIV-1 PR – NK 81	HIV-1 PR – NK 82	HIV-1 PR – NK 83	HIV-1 PR – NK 88	HIV-1 PR – NK 93.1
Strukturverfeinerung					
Auflösungsbereich [Å]	27.77-1.45	28.97-1.73	28.95-1.61	40.94-1.59	27.65-1.61
Anzahl der Reflexe für die Verfeinerung	37396	21742	27502	28823	26661
Anzahl der Reflexe im Testdatensatz	4163	2372	3060	1497	2942
R-Faktor [%]	17.7	16.9	16.8	21.2	17.6
Freier R-Faktor [%]	19.9	20.0	20.3	24.3	19.3
RMSD-Werte					
Bindungslängen [Å]	0.007	0.007	0.007	0.007	0.008
Bindungswinkel [°]	1.153	1.121	1.201	1.143	1.330
Durchschnittliche B-Werte					
Protein	13.8	12.2	18.9	12.9	16.7
Inhibitor	20.9	18.5	15.9	10.6	11.8
Wasser	28.0	27.4	32.8	23.6	29.0
Weitere Liganden	28.6	27.2	23.6	18.3	24.8

	HIV-1 PR – NK 81	HIV-1 PR – NK 82	HIV-1 PR – NK 83	HIV-1 PR – NK 88	HIV-1 PR – NK 93.1
Ramachandran-Plot					
Aminosäuren in bevorzugten Regionen [%]	96.2	96.2	95.6	96.8	97.5
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen [%]	3.8	3.8	4.4	3.2	2.5
Sonstiges					
Anzahl der Aminosäuren	198	198	198	198	198
Anzahl der Atome des Inhibitors	39	41	38	40	39
Anzahl der Wassermoleküle	291	250	267	250	206
Anzahl der Atome weiterer Liganden	21	11	11	3	17
PDB-Code	3QBF	3QRM	3QPI	3QRS	3QRO

Tabelle 9: Kristallographische Tabelle zu den Strukturen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 81, NK 82, NK 83, NK 88 und NK 93.1

Die Differenzelektronendichte in der Bindetasche definiert jeweils gut die Struktur und Anordnung der verschiedenen Liganden in der Bindetasche, wie Abbildung 42 zeigt.

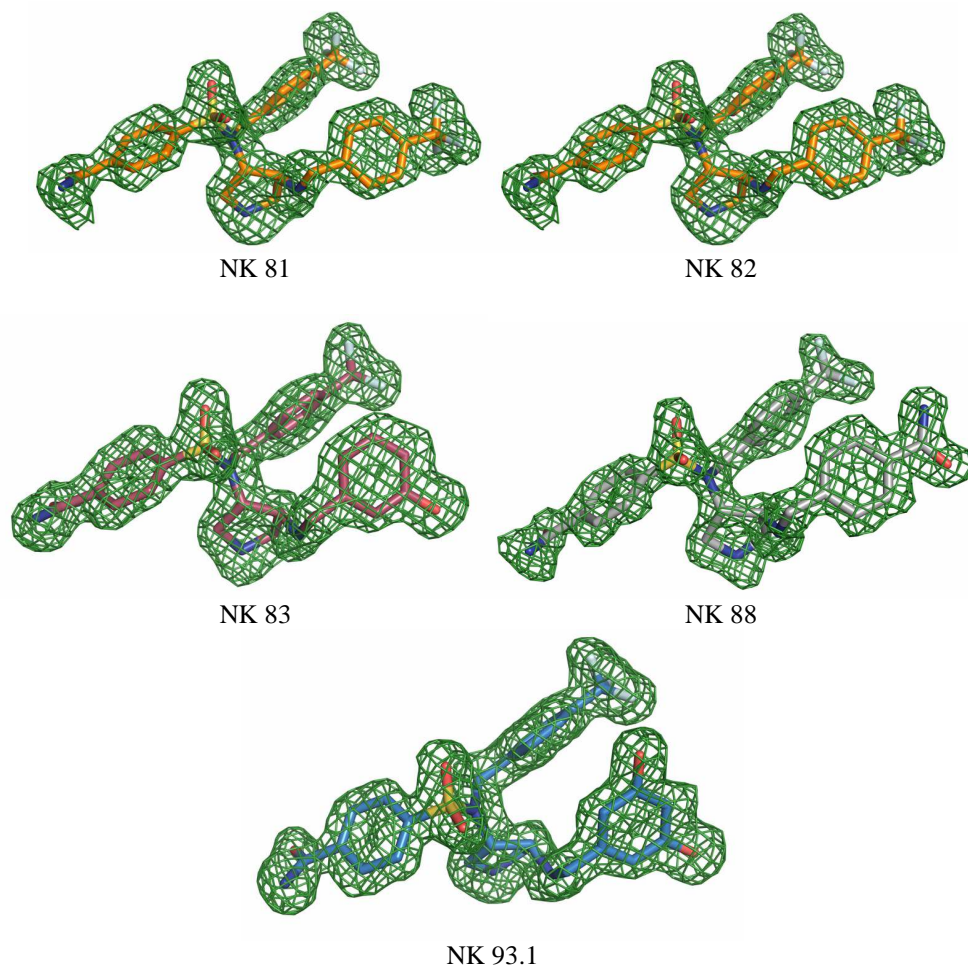


Abbildung 42: $F_o - F_c$ -Elektronendichtekarten der dreiarmligen Pyrrolidinderivate
 σ -Level: 2.5

	HIV-1 PR- NK 81	HIV-1 PR- NK 82	HIV-1 PR- NK 83	HIV-1 PR- NK 88	HIV-1 PR- NK 93.1
HIV-1 PR- NK 81	-	0.25	0.26	0.40	0.45
HIV-1 PR- NK 82	0.25	-	0.26	0.34	0.45
HIV-1 PR- NK 83	0.26	0.26	-	0.40	0.38
HIV-1 PR- NK 88	0.40	0.34	0.40	-	0.48
HIV-1 PR- NK 93.1	0.45	0.45	0.38	0.48	-

Tabelle 10: RMSD-Werte [\AA] der Strukturen der dreiarmligen Pyrrolidinderivate

Die Ähnlichkeit der fünf Strukturen der HIV-1 Protease zueinander zeigen die berechneten RMSD-Werte für die C α -Atome. Die Abweichungen liegen zwischen 0.25 \AA und 0.48 \AA .

Vergleich der Bindungsmodi der Inhibitoren

Ein Vergleich der Bindungsmodi der fünf dreiarmligen Pyrrolidinderivate zeigt, dass diese in den jeweiligen Strukturen einen sehr ähnlichen Bindungsmodus eingehen. Abbildung 43 zeigt eine Überlagerung der Koordinaten der Inhibitoren. Die Besetzung der Taschen der HIV-1 Protease erfolgte jeweils analog. Der Teil des Inhibitors, der die Sulfonamidgruppe trägt, adressiert jeweils die S2-Tasche des Proteins, während die verschiedenen Substituenten in Position R 1 die S2'-Tasche besetzen. Die Substituenten in Position R 2 ragen in die S1'-Tasche der HIV-1 Protease. Die S1-Tasche verbleibt durch den Inhibitor stets unbesetzt.

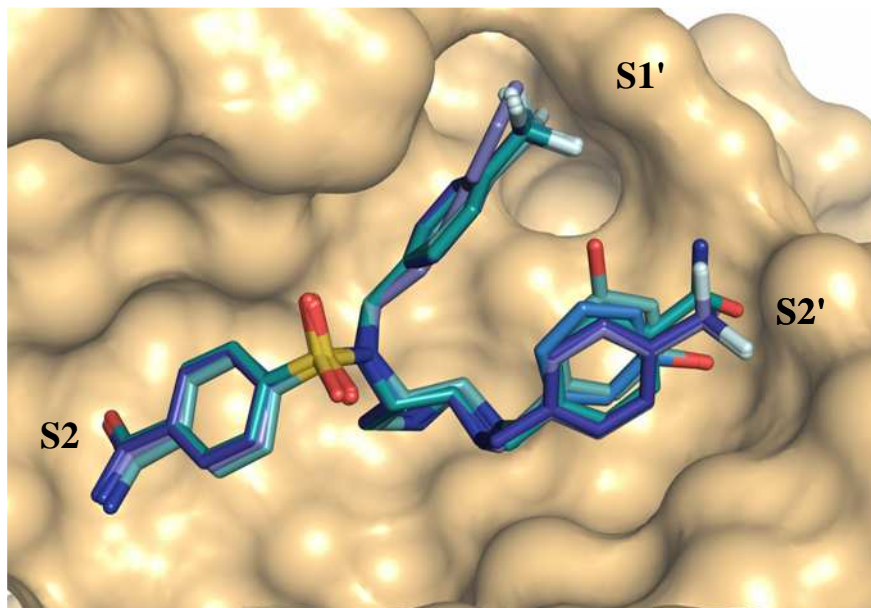


Abbildung 43: Überlagerung der Koordinaten der fünf Inhibitoren NK 81, NK 82, NK 83, NK 88 und NK 93.1 in der Bindetasche der HIV-1 Protease (beige)
Die Flap-Region des Proteins wurde entfernt.

Gemeinsamkeiten im Bindungsmotiv stellen insbesondere die Wechselwirkungen des Pyrrolidinstickstoffs mit den katalytischen Aspartaten und die Interaktionen der Sauerstoffe der Sulfonamidgruppe mit den Amidstickstoffen des Rückgrats der Flap-Aminosäuren Ile50A und Ile50B dar. Auch die Wechselwirkungen des Carboxamids mit der Aminosäure Asp30B in der S2-Tasche des Inhibitors können in jeder der fünf Strukturen vergleichbar beobachtet werden: Der Stickstoff des Carboxamids interagiert mit der Seitenkette, der Sauerstoff mit der Amidgruppe des Rückgrats von Asp30B. Van der Waals-Interaktionen dieses Substituenten sind hier darüber hinaus möglich zu den Aminosäuren Ala28B, Asp30B, Val32B, Gly48B, , Ile50A, Ile50B und Ile84B. Eine weitere Gemeinsamkeit im Bindungsmodus der Inhibitoren ist die Möglichkeit zur Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung zu Asp25A durch den sekundären Stickstoff der Inhibitoren.

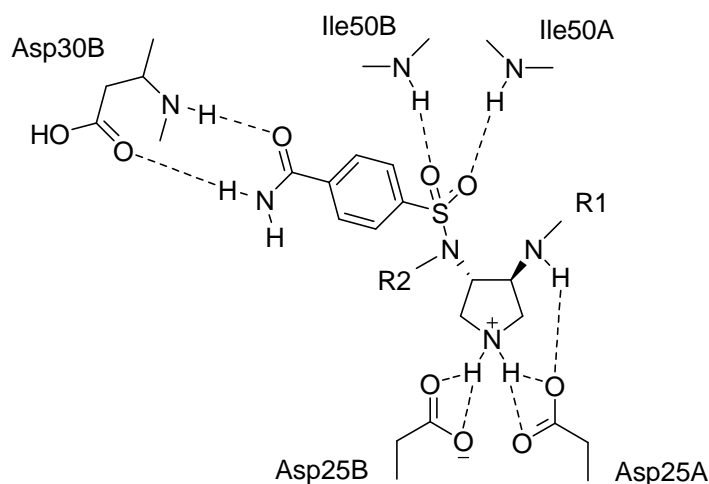


Abbildung 44: Gemeinsamkeiten im Bindungsmodus der dreiarmigen Pyrrolidininhibitoren

In Position R 2 der Inhibitoren ist, mit Ausnahme des Inhibitors NK 81, eine Trifluormethylbenzylgruppe vorhanden. Die Position der Fluoratome dieser Gruppe wird durch die Elektronendichte in den entsprechenden Strukturen gut definiert: Die Trifluormethylgruppe ist nicht ungeordnet, wie in der Struktur des Komplexes der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor AB 111 (PDB-Code: 2QNN [64]) beobachtet werden konnte. Es bestehen Interaktionen zwischen der Aminosäure Arg8B und zwei Fluoratomen der Trifluormethylgruppe, wie Abbildung 45 zeigt.

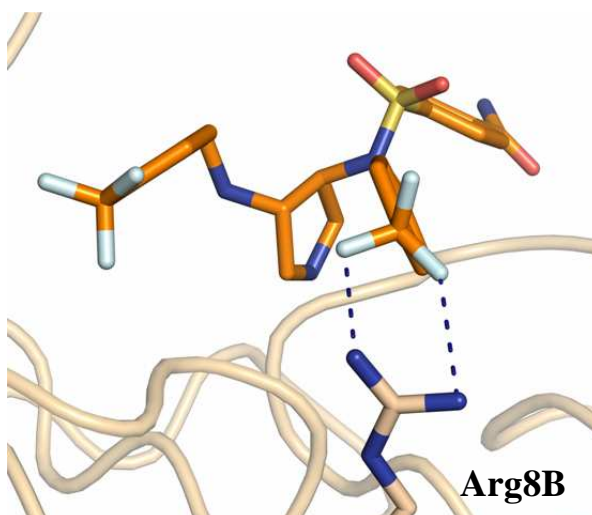


Abbildung 45: Interaktionen der Trifluormethylgruppe des Inhibitors NK 82 (orange) in der S1'-Tasche

Organische Fluorsubstituenten sind aufgrund ihrer geringen Polarisierbarkeit schwache Wasserstoffakzeptoren und scheinen kaum starke Wasserstoffbrückenbindungen auszu-

bilden, wie eine Untersuchung struktureller Daten ergab [95]. Nichtsdestotrotz besitzen ungefähr 20% der pharmazeutischen Wirkstoffe heutzutage einen oder mehrere Fluor-substituenten, die oft benachbart zu Wasserstoffbrückendonoren zu finden sind. C-F Interaktionen mit der Guanidiniumgruppe des Arginins werden häufig beobachtet, so dass dieser Seitenkette ein fluorophiler Charakter zugeschrieben wird [96]. Van der Waals-Interaktionen dieses Substituenten werden zu den Aminosäuren Leu23B, Gly27A, Gly48A, Gly49A, Pro81B, Val82B und Ile84B ausgebildet. Der Inhibitor NK 81 besitzt als einziger in dieser Position einen *p*-Phenylpropyl-Substituenten, der van der Waals-Interaktionen zu eben diesen Aminosäuren und zusätzlich zu Arg8B eingeht.

Die Inhibitoren NK 81 und NK 82 besitzen in Position R 1 ebenfalls eine Trifluormethylbenzylgruppe als Substituenten. Wiederum ist eine geordnete Konformation der Trifluormethylgruppe in der Elektronendichte erkennbar. In der S2'-Tasche ist die Ausbildung verschiedener Wechselwirkungen möglich, wie in Abbildung 46 gezeigt wird. Die Fluoratome können mit der Seitenkette und dem Amidstickstoff des Rückgrats der Aminosäure Asp30A und dem Amidstickstoff des Rückgrats von Asp29A interagieren.

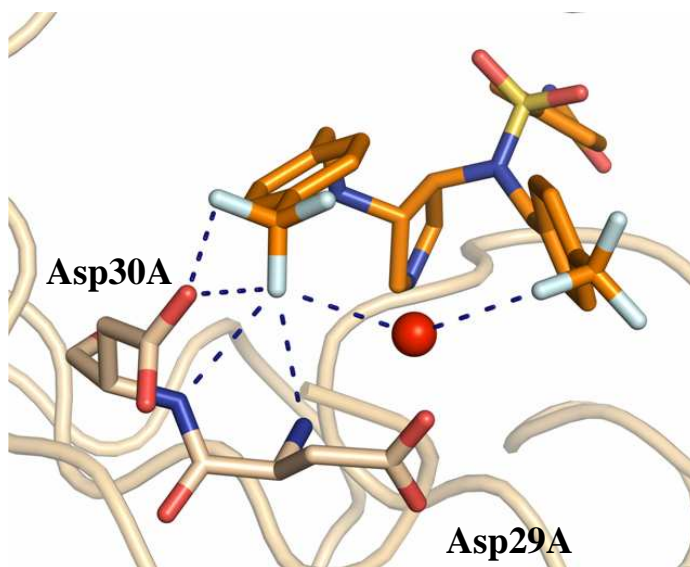


Abbildung 46: Interaktionen der Trifluormethylgruppe des Inhibitors NK 82 (orange) in der S2'-Tasche

Eine weitere Interaktion des Inhibitors NK 82 zu einem Fluoratom der Trifluormethylgruppe in der S1'-Tasche, vermittelt über ein Wassermolekül, ist möglich. Dieses Wassermolekül ist auch in der Struktur des Komplexes der HIV-1 PR mit dem Inhibitor NK 81 präsent: Es kann außerdem Wasserstoffbrückenbindungen zu der Seitenkette und

dem Amidstickstoff der Aminosäure Asp29A, zum Carbonylsauerstoff des Rückgrats von Gly27A und zu einem weiteren Wassermolekül ausbilden.

Van der Waals-Wechselwirkungen der Substituenten in der S2'-Tasche sind zu den Aminosäuren Ala28A, Asp29A, Asp30A, Val32A, Ile47A, Gly48A, Ile84A und Ile50B möglich. Der Inhibitor NK 83 ist in meta-Position mit einer Hydroxygruppe substituiert, die Wechselwirkungen sowohl mit der Seitenkette und dem Amidstickstoff des Proteinrückgrats der Aminosäure Asp30A als auch mit dem Amidstickstoff des Rückgrats von Asp29A ausbilden kann. Der Inhibitor NK 93.1 besitzt zwei Hydroxygruppen in meta-Position am aromatischen Ringsystem. Eine der Hydroxygruppen befindet sich in der gleichen Position wie die des Inhibitors NK 83 und bildet auch vergleichbare Wechselwirkungen aus. Die andere Hydroxygruppe interagiert mit dem Amidstickstoff und dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure Gly48A.

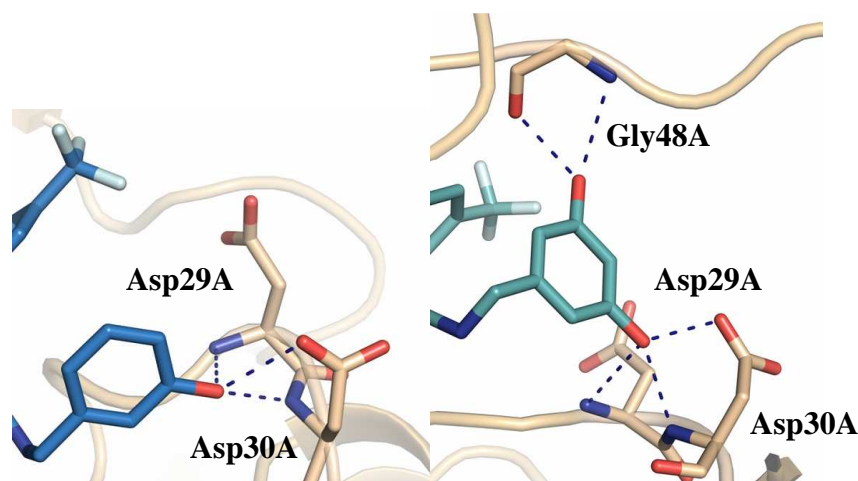


Abbildung 47: Interaktionen der Hydroxygruppen der Inhibitoren NK 83 (links, blau) und NK 93.1 (rechts, türkis) in der S2'-Tasche

Bedingt durch die unterschiedliche Position ihrer Interaktionspartner nimmt die Aminosäure Asp30A in den Strukturen der Komplexe mit den Inhibitoren NK 83 und NK 93.1 eine etwas andere Konformation ein als in den Strukturen mit den Inhibitoren NK 81 und NK 82, die die S2'-Tasche mit der Trifluormethylbenzylgruppe adressieren: Die Seitenkette neigt sich in Richtung der Hydroxygruppe, um die Interaktion zu ermöglichen. Betrachtet man nun die Konformation der Aminosäure in der Struktur mit dem Inhibitor NK 88, der eine Carboxamidgruppe in para-Position am Ring trägt, fällt auf, dass die Seitenkette von Asp30A hier weggedreht ist. Der Sauerstoff des Carboxamids interagiert hier vermittelt über ein Wassermolekül mit der Seitenkette. Eine weitere Wechselwirkung ist möglich zum Amidstickstoff des Rückgrats von Asp30A.

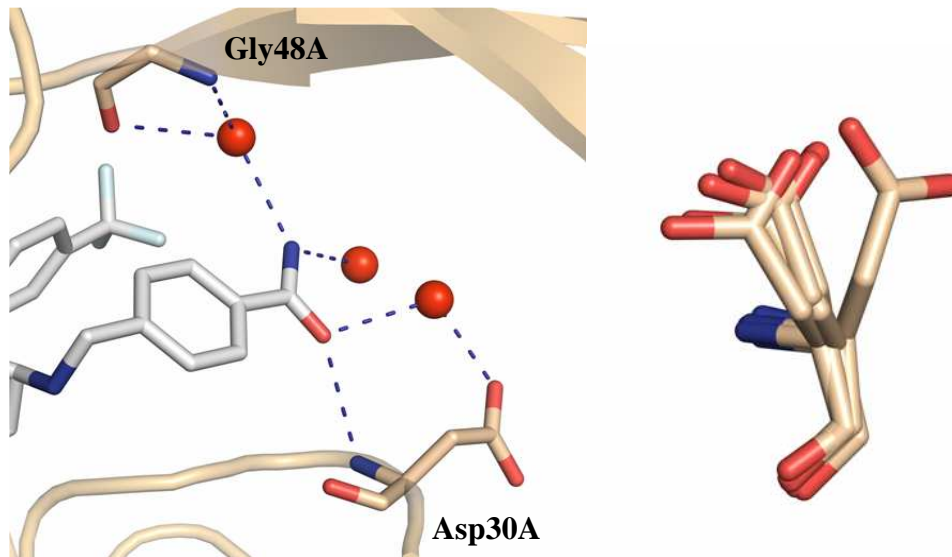


Abbildung 48: Links: Interaktionen der Carboxygruppe des Inhibitors NK88 (grau) in der S2'-Tasche
Rechts: Konformationen des Aspartats 30A in den fünf Strukturen

Der Stickstoff des Carboxamids geht keine direkten Interaktionen zum Protein ein. Jedoch sind Interaktionen zu zwei Wassermolekülen möglich, von denen eines dann mit dem Amidstickstoff und dem Carbonylsauerstoff des Rückgrats von Gly48A in Kontakt steht.

Zusätzliche Moleküle in der S1-Tasche der HIV-1 Protease

In der vom jeweiligen Inhibitor nicht besetzten S1-Tasche der HIV-1 Protease wurde ebenfalls Differenzelektronendichte beobachtet, die unterschiedlichen Molekülen zugeordnet werden konnte. In der Struktur des Komplexes mit dem Inhibitor NK 81 befindet sich ein Glycerol-Molekül in der S1-Tasche, welches vermutlich vom Einsatz des Glycerols als Kryoprotektivums stammt. Abbildung 49 zeigt den Bindungsmodus des Glycerolmoleküls. Eine der Hydroxygruppen interagiert mit der Carbonylgruppe des Rückgrats von Gly48B der HIV-1 Protease. Die verbleibenden Hydroxygruppen gehen jedoch keine Wasserstoffbrückenbindungen ein.

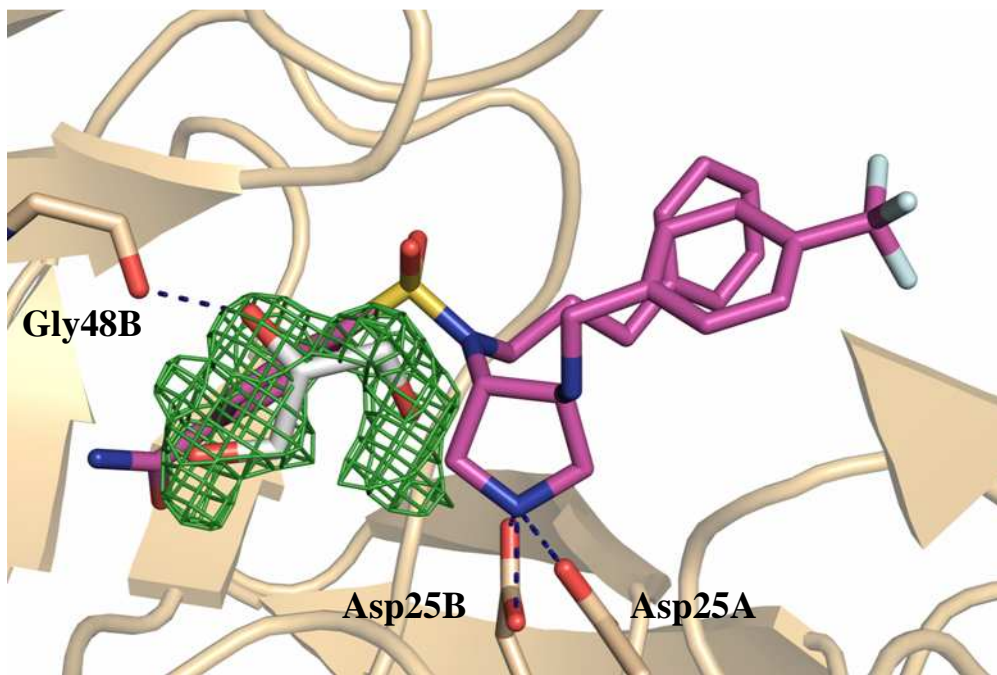


Abbildung 49: Bindungsmodus und $F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte (σ -Level 3.0) des Glycerolmoleküls (grau) in der S1-Tasche der Struktur des Komplexes der HIV-1 PR mit dem Inhibitor NK 81 (violett)

Allein Wassermoleküle besetzen diese Tasche in der Struktur mit dem Inhibitor NK 88. Die Differenzelektronendichte in den Strukturen der Komplexe mit NK 82, NK 83 und NK 93.1 konnte dem Molekül Dithiandiol zugeordnet werden. In den Kristallisationsbedingungen ist Dithiothreitol in einer finalen Konzentration von 100 mM enthalten, um die Ausbildung unerwünschter, die Kristallisation behindernder Disulfidbrücken zwischen Cystein-Aminosäuren in der HIV-1 Protease zu reduzieren. Bei der Reaktion mit über Disulfidbrücken verknüpften Cystein-Aminosäuren wird Dithiothreitol selbst zu dem cyclischen Disulfid Dithiandiol oxidiert [97], wie Abbildung 50 zeigt.

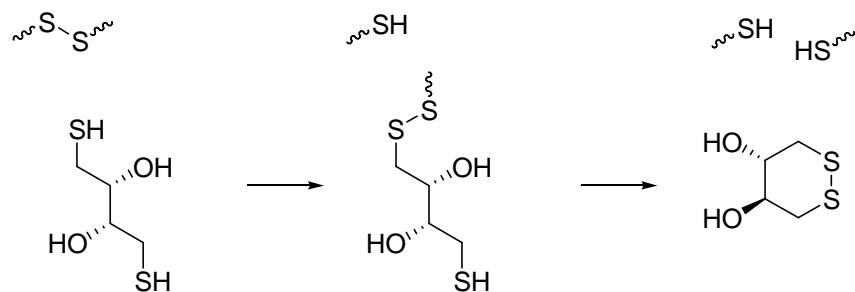


Abbildung 50: Reduktion von Disulfiden im Protein und Oxidation von DTT zu DTD

In den drei Kristallstrukturen wird das Molekül Dithiandiol unterschiedlich gut durch die Differenzelektronendichte definiert. In der Struktur des Komplexes mit dem Inhibitor NK 83 zeigt die Elektronendichte deutlich die Struktur und Konformation des Moleküls, wie Abbildung 51 zeigt. In den Strukturen mit den Inhibitoren NK 82 und NK 93.1 ist ebenfalls deutlich zu erkennen, welche Position das Dithiandiol in der S1-Tasche einnimmt, jedoch wurde die Besetzung auf 61% bzw. 77% verfeinert. Auch nach Einbau des Dithiandiol in die Struktur des Komplexes der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 82 ist eine ResteElektronendichte erkennbar: Vermutlich bindet also Dithiandiol nicht in der Gesamtheit aller Proteinmoleküle im Kristall, sondern teilweise auch weitere Moleküle wie zum Beispiel Wasser oder Glycerol. Die verbleibende Differenzelektronendichte, die der Besetzung durch diese Moleküle entsprechen sollte, ließ sich jedoch diesbezüglich nicht im Detail interpretieren.

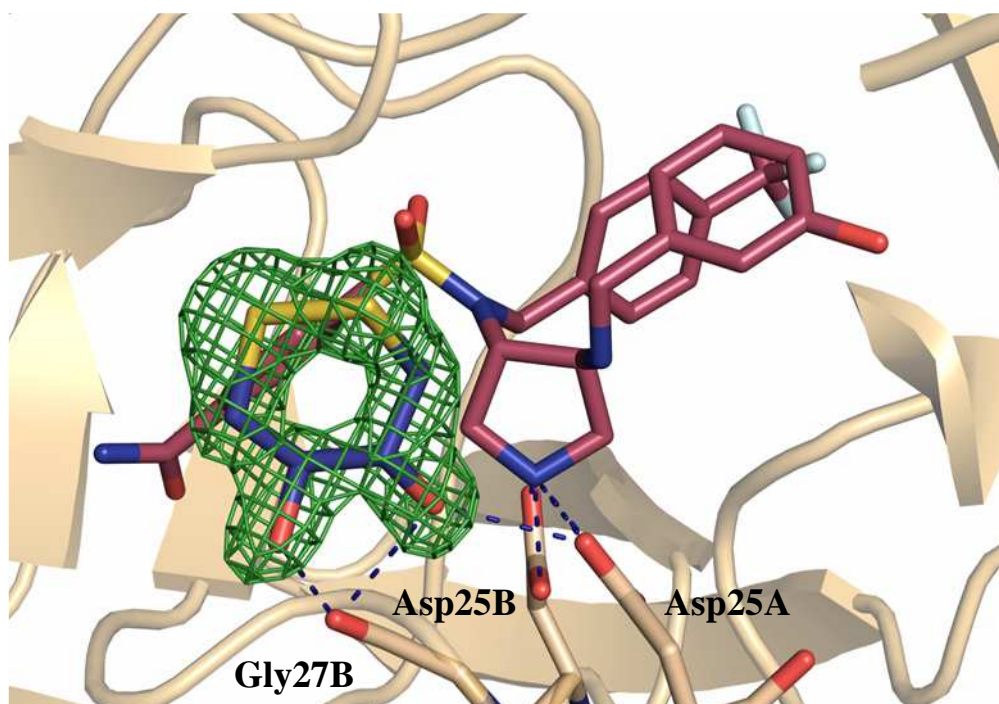


Abbildung 51: Bindungsmodus und $F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte (σ -Level: 3.0) des Dithiandiolmoleküls (blau) in der S1-Tasche der Struktur des Komplexes der HIV-1 PR mit dem Inhibitor NK 83 (dunkelrot)

Die Wechselwirkungen des Dithiandiolmoleküls mit dem Protein sind in den Strukturen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 82, NK 83 und NK 93.1 die gleichen. Beide Hydroxygruppen können Wasserstoffbrückenbindungen zur Carbonylgruppe des Proteinrückgrats der Aminosäure Gly27B ausbilden. Eine weitere Interak-

tion ist zwischen einer der Hydroxygruppen und der Seitenkette eines der katalytischen Aspartate, Asp25A, möglich.

Zusammenfassung und Diskussion

Auf der Grundlage vorangegangener Arbeiten gelang es erfolgreich, eine Serie dreiarmer, nicht symmetrischer Pyrrolidinderivate als Inhibitoren der HIV-1 Protease zu entwickeln. Die kinetischen Messungen ergaben Inhibitionswerte bis hin in den dreistellig nanomolaren Bereich. Der Bindungsmodus der Inhibitoren zu der HIV-1 Protease konnte durch Co-Kristallisation und anschließender Strukturlösung aufgeklärt werden. Die Bindung der Inhibitoren zum Protein erfolgt in den jeweiligen Strukturen vergleichbar. Der Substituent, der die S2-Tasche besetzt, trägt jeweils einen Carboxamidsubstituenten am Ringsystem, der polare Wechselwirkungen ausbildet. Dieser Teil des Inhibitors wurde im Rahmen dieser Arbeit noch nicht variiert. Hier bietet die Einführung und das Testen verschiedener polarer Substituenten Potential für eine weitere Optimierung der Inhibitoren.

Der Charakter der Interaktionen der Trifluormethylgruppen konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Wie die K_i -Werte der Inhibitoren NK 81 und NK 82 jedoch zeigen, ist die Bindung der Trifluormethylbenzylgruppe in der S1'-Tasche im Vergleich zum Phenylpropylrest bevorzugt.

Die Ergebnisse des Enzymassays lassen einen deutlichen Trend zur Bevorzugung der polaren Substituenten in der S2-Tasche erkennen. Die Affinität der hydroxybenzylsubstituierten Inhibitoren NK 83 und NK 93.1 ist deutlich höher im Vergleich zu den Inhibitoren mit den trifluormethylsubstituierten Resten in dieser Position. Die Inhibition von NK 88 mit der Carboxamidfunktionalität ist dagegen nur geringfügig besser.

Im Unterschied zu den vorausgehenden Studien blieb die S1-Tasche in den Kristallstrukturen der HIV-1 Protease im Komplex mit den dreiarmligen Pyrrolidinderivaten unbesetzt. Dies führte dazu, dass sich kleine Moleküle, die mit den Kristallen in Kontakt kamen, in dem verbleibenden Raum der Bindetasche platzieren konnten. Die Aminosäuren Gly27B und Gly48B werden von Dithiandiol bzw. Glycerol adressiert. Das Design für eine potentielle Erweiterung der Inhibitoren um einen vierten Arm könnte dieses Interaktionsmuster aufgreifen und es als Ideengeber für einen weiteren Zyklus strukturbasierter Designs verwenden.

Ein Vergleich des vierarmigen symmetrischen Inhibitors AB 111 mit dem Inhibitor NK 88 zeigt, dass viele Gemeinsamkeiten im Bindungsmodus bestehen. Die Wechsel-

wirkungen des Pyrrolidinrings mit den katalytischen Aspartaten, die Interaktion der Sauerstoffe der Sulfonamidgruppe mit der Flap-Region und die Wasserstoffbrückenbindungen der Carboxamidgruppe mit der Aminosäure Asp30B in der S2-Tasche sind erhalten geblieben. Die Trifluormethylbenzylgruppe der Inhibitoren NK 82, NK 83, NK 88 und NK 93.1 nimmt eine vergleichbare Position in der S1'-Tasche ein wie der Inhibitor AB 111. Unterschiedlich ist nur, dass die Trifluormethylgruppe von AB 111 keine eindeutige Konformation der Fluoratome aufweist.

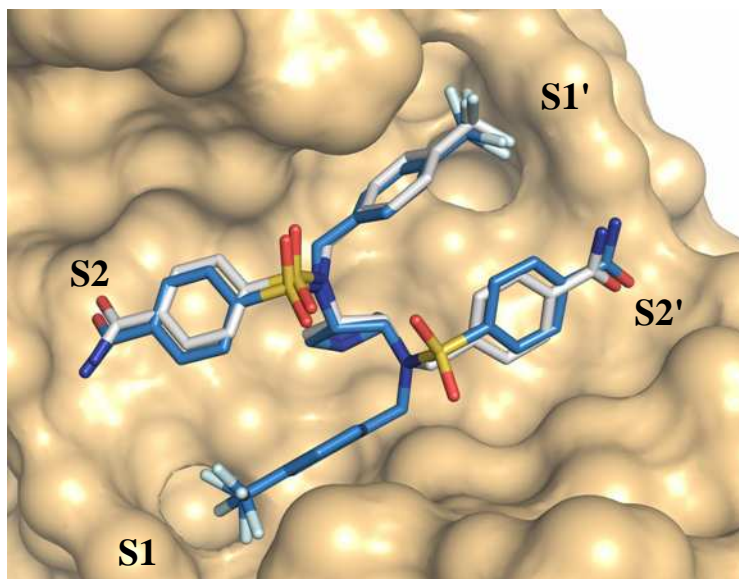


Abbildung 52: Überlagerung der Koordinaten der Inhibitoren AB 111 (türkis) und NK 88 (grau) in der Bindetasche der HIV-1 Protease

Der tertiäre Stickstoff einer der Sulfonamidgruppen von AB 111 wurde bei den dreiar-
migen Pyrrolidinderivaten durch einen sekundären Stickstoff ersetzt: Eine zusätzliche
Interaktion zu Asp25A ist so möglich. Die entsprechende Sulfongruppe ist in den neuen
dreiar-
migen Inhibitoren nicht mehr vorhanden – da in der Kristallstruktur des Komplexes
mit AB 111 keine gerichtete Wechselwirkung erkennbar war, wurde es beim Design
nicht berücksichtigt. Die Carboxamidgruppe in der S2'-Tasche nimmt in den Strukturen
der Komplexe der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren AB 111 und NK 88 eine ver-
gleichbare Position ein und bildet die gleichen Wechselwirkungen aus. Auch die Kon-
formation der Aminosäure Asp30A stimmt überein. Die hydroxysubstituierten Reste
wurden im Design der vierarmigen Inhibitoren nicht eingesetzt, so dass ein direkter
Vergleich hier nicht möglich ist.

Die Reduzierung der Anzahl der "Arme" der Inhibitoren von vier auf drei bringt absolut
betrachtet scheinbar keinen Gewinn an Affinität. Dies überrascht um so mehr, da für die

zweite Sulfongruppe der vierarmigen Inhibitoren, die im Protein keinen Wechselwirkungspartner findet, ein nicht kompensierter Preis für ihre Desolvatation bezahlt werden muss. Der vierarmige Inhibitor AB 111 hat einen zweistellig nanomolaren K_i -Wert, an den die dreiarmigen Derivate nicht heranreichen. Zusätzliche Interaktionen in der S1-Tasche würden sicherlich einen deutlichen Affinitätsgewinn erzielen. Jedoch konnte durch die Verkleinerung das Molekulargewicht der Inhibitoren reduziert werden und somit ihr Arzneistoffcharakter erhöht werden. Die Affinitäten müssen somit auch relativ zum Molekulargewicht betrachtet werden.

2.3.6 Bizyklische Pyrrolidine als Inhibitoren der HIV-1 Protease

Einleitung

Ein Pyrrolidinring als die katalytischen Aspartate adressierender Grundbaustein einer Vielzahl von Inhibitoren der HIV-1 Protease wurde in vorangegangenen Studien etabliert. [50] Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde von Nina Klee ein neues Grundgerüst entwickelt: Durch Kombination des Pyrrolidins mit einem Pyrazindion sollen die Flap-Region der HIV-1 Protease adressiert und gleichzeitig weniger flexible und damit entropisch begünstigte Inhibitoren geschaffen werden. Passende Substituenten zur Besetzung der Taschen der HIV-1 Protease wurden mit Hilfe von Docking ausgewählt. [98] Die Ergebnisse aus dem Enzymassay und Co-Kristallisation dieser bizyklischen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren mit der HIV-1 Protease werden in diesem Kapitel vorgestellt.

Ergebnisse

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der Inhibitoren sowie für die Co-Kristallisation wurde die HIV-1 Protease Mutante Q7K L33I L63I verwendet. Abbildung 53 zeigt das Grundgerüst der bizyklischen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren der HIV-1 Protease.

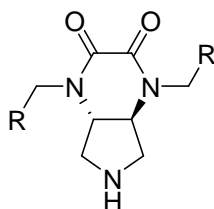


Abbildung 53: Grundgerüst der bizyklischen Pyrrolidine

Kinetik

Die K_i -Werte der bityklischen Pyrrolidine zeigt Tabelle 11.

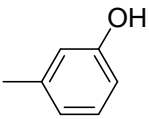
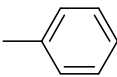
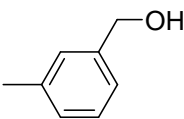
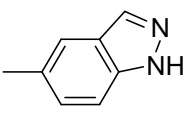
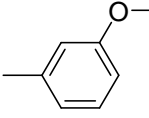
Bezeichnung des Inhibi- tors	R	K_i [μ M]
NK 101		3.8
NK 102		17.2
NK 143		21.9
NK 144		55.2
NK 150		21.6

Tabelle 11: K_i -Werte der bityklischen Pyrrolidin-basierten Inhibitoren

Co-Kristallisation der Inhibitoren mit der HIV-1 Protease

Die Inhibitoren NK 101, NK 102, NK 143 und NK 150 wurden mit der HIV-1 Protease zur Kristallisation angesetzt. Innerhalb einiger Tage wuchsen in den Kristallisationsansätzen mit dem Inhibitor NK 101 große, wohlgeformte, quaderförmige Kristalle, die sich in der Form von den eher plättchenförmigen Kristallen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den dreiarmigen Pyrrolidin-Inhibitoren unterschieden. Nach *Streak-Seeding* erfolgte auch in den Ansätzen mit den anderen Inhibitoren ein Wachstum vergleichbarer Kristalle.

Datensammlung und Strukturverfeinerung

An der Beamline 14.2 des Synchrotrons BESSY II konnten Datensätze von Komplexen der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 101 und NK 143 gesammelt werden. Die

Datensammlung von Kristallen der Komplexe mit den Inhibitoren NK 102 und NK 150 war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Tabelle 12 zeigt die kristallographischen Parameter, die die Daten und die Auswertung beschreiben. Beiden Datensätzen konnte die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12$ zugeordnet werden, in der die asymmetrische Einheit ein HIV-1 Protease Dimer umfasst. Aufgrund der hohen Auflösung der Strukturen von 1.38\AA bzw. 1.45\AA war eine anisotrope Verfeinerung der B-Werte möglich.

Bezeichnung der Struktur	HIV-1 PR – NK 101	HIV-1 PR – NK 143
Datensammlung und Prozessierung		
Wellenlänge [\AA]	0.91841	0.91841
Raumgruppe	$P2_12_12$	$P2_12_12$
Einheitszellparameter [$\text{\AA},^\circ$]	$a = 58.4, b = 85.7, c = 46.9;$ $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$	$a = 57.9, b = 85.6, c = 46.8;$ $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$
Auflösungsbereich [\AA]	30.00-1.38 (1.40-1.38)	50.00-1.45 (1.48-1.45)
Anzahl einzigartiger Reflexe	47925 (2263)	41637 (2067)
R_{sym} [%]	3.8 (36.5)	5.7 (47.5)
Vollständigkeit [%]	98.2 (95.1)	98.5 (98.9)
Redundanz	5.0 (4.3)	4.2 (4.1)
I / σ	38.6 (3.6)	23.6 (2.8)
Matthews-Koeffizient [$\text{\AA}^3/\text{Da}$]	2.7	2.7
Lösungsmittelgehalt [%]	54.7	54.2
Strukturverfeinerung		
Auflösungsbereich [\AA]	29.18-1.38	23.67-1.45
Anzahl der Reflexe für die Verfeinerung	43085	39386
Anzahl der Reflexe im Testdatensatz	4815	2071
R-Faktor [%]	14.9	15.1
Freier R-Faktor [%]	18.1	18.3

RMSD-Werte		
Bindungslängen [Å]	0.006	0.006
Bindungswinkel [°]	1.228	1.231
Durchschnittliche B-Werte		
Protein	16.3	16.9
Inhibitor	20.6	18.9
Wasser	35.6	34.4
Weitere Liganden	20.4	19.8
Ramachandran Plot		
Aminosäuren in bevorzugten Regionen [%]	96.2	96.2
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen [%]	3.8	3.8
Sonstiges		
Anzahl der Aminosäuren	198	198
Anzahl Atome des Inhibitors	29	33
Anzahl der Wassermoleküle	294	243
Anzahl der Atome weiterer Liganden	3	3
PDB-Code	3QN8	3QP0

Tabelle 12: Kristallographische Tabelle zu den Strukturen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 101 und NK 143

Die Differenzelektronendichte in der Bindetasche definiert jeweils gut die Struktur und Anordnung der Liganden in der Bindetasche, wie die Abbildungen 54 und 55 zeigen.

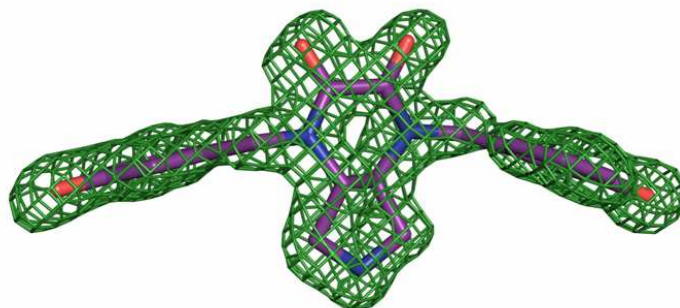


Abbildung 54: F_0 - F_c -Elektronendichtekarte für den Inhibitor NK 101 (σ -Level: 3.5)

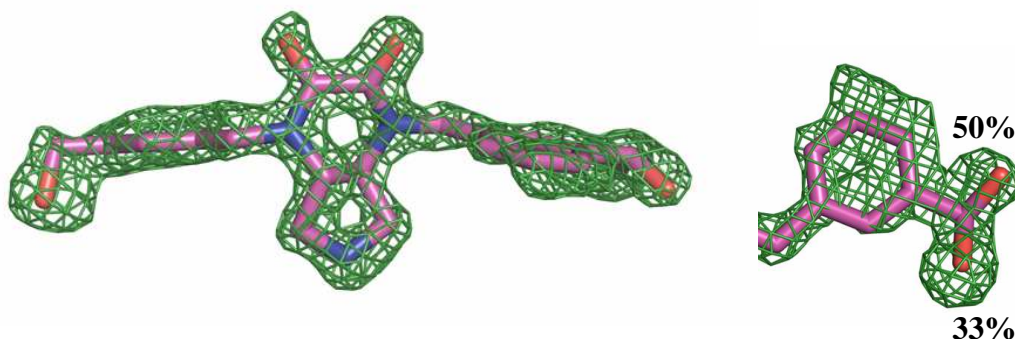


Abbildung 55: F_0 - F_c -Elektronendichtekarte für den Inhibitor NK 143 (σ -Level: 3.5)

Die Besetzung des Inhibitors NK 143 wurde zu 83% verfeinert. Eine der Hydroxymethylengruppen liegt in zwei Konformationen vor, wie Abbildung 55 zeigt. Diese wurden zu 50% und 33% verfeinert. Zusätzliche Differenzelektronendichte wurde entlang des aromatischen Ringsystems dieses Substituenten und nahe der Hydroxymethylengruppe, deren Besetzung zu 50% verfeinert wurde, beobachtet. Die Ursache dafür konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Die Qualität der Elektronendichte im Bereich der Flap der HIV-1 Protease war im Verhältnis zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit verfeinerten Strukturen reduziert. Insbesondere in der Struktur des Komplexes der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 101 konnte nahe den Aminosäuren Ile50A bis Gly52A und Ile47B bis Val56B Differenzelektronendichte beobachtet werden. Die Verfeinerung einer alternativen Konformation des Proteins in diesen Bereichen ließ sich jedoch nicht realisieren. Eine verhältnismäßig hohe Beweglichkeit in diesem Bereich scheint jedoch wahrscheinlich. In Tabelle 13 sind die durchschnittlichen B-Werte für diesen Bereich den durchschnittlichen B-Werten für das gesamte Protein gegenübergestellt. Als Vergleich werden dabei bei-

spielhaft die Kristallstrukturen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den dreiarmligen Pyrrolidinderivaten NK 81 und NK 82 herangezogen, bei deren Verfeinerung das beobachtete Phänomen nicht auftrat.

Bezeichnung der Kristallstruktur	Durchschnittliche B-Werte im Bereich Ile50A-Gly52A / Ile47B-Val56B	Durchschnittliche B-Werte des Gesamtproteins
HIV-1 PR – NK 101	26.0	16.3
HIV-1 PR – NK 143	22.2	16.9
HIV-1 PR – NK 81	21.2	13.8
HIV-1 PR – NK 82	22.5	12.2

Tabelle 13: Durchschnittliche B-Werte im Bereich Ile50A-Gly52A / Ile47B-Val56B und des Gesamtproteins der Kristallstrukturen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 101, NK 143, NK 81 und NK 82

Die B-Werte der Kristallstrukturen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den bizyklischen Pyrrolidininhibitoren sind im Verhältnis zu den anderen beiden Strukturen weder relativ noch absolut signifikant erhöht. Allgemein ist zu beobachten, dass die B-Werte im Bereich der Flap-Region höher sind als der Durchschnitt.

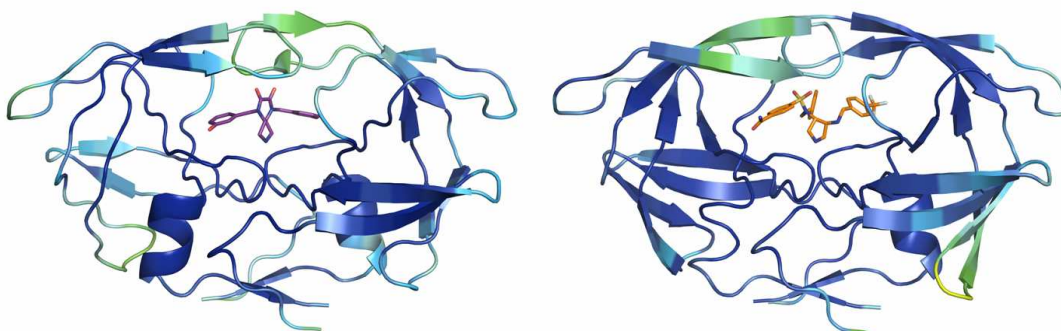


Abbildung 56: Kristallstrukturen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 101 (links) und NK 81 (rechts), eingefärbt in Abhängigkeit vom B-Wert (niedriger B-Wert=blau, hoher B-Wert=grün)

Dies verdeutlicht auch Abbildung 56, in der die Strukturen der Komplexe der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 101 und NK 81 in Abhängigkeit vom B-Wert eingefärbt sind.

Vergleich der Bindungsmodi der Inhibitoren

Eine Überlagerung der Koordinaten der Inhibitoren NK 101 und NK 143 zeigt, dass diese einen sehr ähnlichen Bindungsmodus zum Protein einnehmen. Lediglich die Position der aromatischen Ringe ist leicht verändert, damit die jeweiligen Interaktionen der Hydroxygruppen in der S2- und S2'-Tasche ausgebildet werden können.

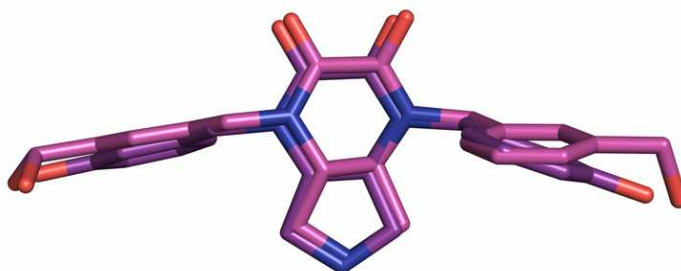


Abbildung 57: Überlagerung der Koordinaten der Inhibitoren NK 101 (lila) und NK 143 (violett)

Der Stickstoff des Pyrrolidinrings interagiert, wie erwartet, mit den katalytischen Asparaten 25A und 25B. Die Carbonylsauerstoffe des Pyrazindions gehen Wechselwirkungen mit der Flap-Region der HIV-1 Protease ein. Während ein Carbonylsauerstoff eine direkte Interaktion zum Amidstickstoff des Rückgrats von Ile50B eingeht, werden weitere Wechselwirkungen über ein Wassermolekül vermittelt. Dieses kann Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidstickstoffen des Rückgrats von Ile50B, Gly51A und Gly51B sowie zum Carbonylsauerstoff von Gly52A eingehen. In der Struktur des Komplexes der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 143 beträgt die Distanz zum Amidstickstoff des Rückgrats von Gly52A 3.5 Å, in der Struktur mit dem Inhibitor NK 101 3.6 Å, so dass hier eine weitere, eher schwache, Wasserstoffbrückenbindung möglich ist. Die Interaktionen mit der Flap-Region im Detail werden am Beispiel des Inhibitors NK 143 in Abbildung 60 gezeigt. Eine Kristallstruktur mit einem im Hinblick auf die Flap-Region alternativen Bindungsmodus des Inhibitors NK 101 wird in Kapitel 2.3.7 vorgestellt.

Die Substituenten des bizyklischen Grundgerüsts besetzen die S2- und S2'-Tasche der HIV-1 Protease. Die Hydroxygruppen des Inhibitors NK 101 interagieren in beiden Taschen mit den Amidstickstoffen der Aminosäuren Asp29 und Asp30. Weiterhin sind Wechselwirkungen zu jeweils zwei Wassermolekülen möglich. Van der Waals-Wechselwirkungen dieser Substituenten, insbesondere der aromatischen Ringe, werden zu den Aminosäuren Ala28, Asp29, Asp30, Val 32, Ile47, Ile50 und Ile84 ausgebildet.

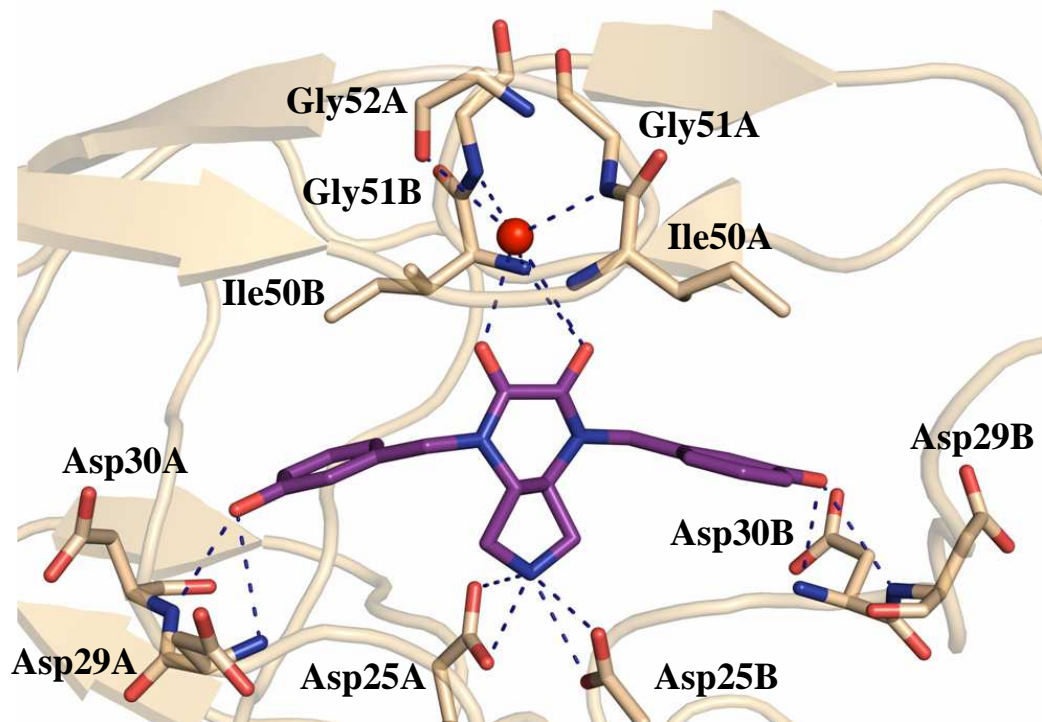


Abbildung 58: Bindungsmodus des Inhibitors NK 101 (lila)

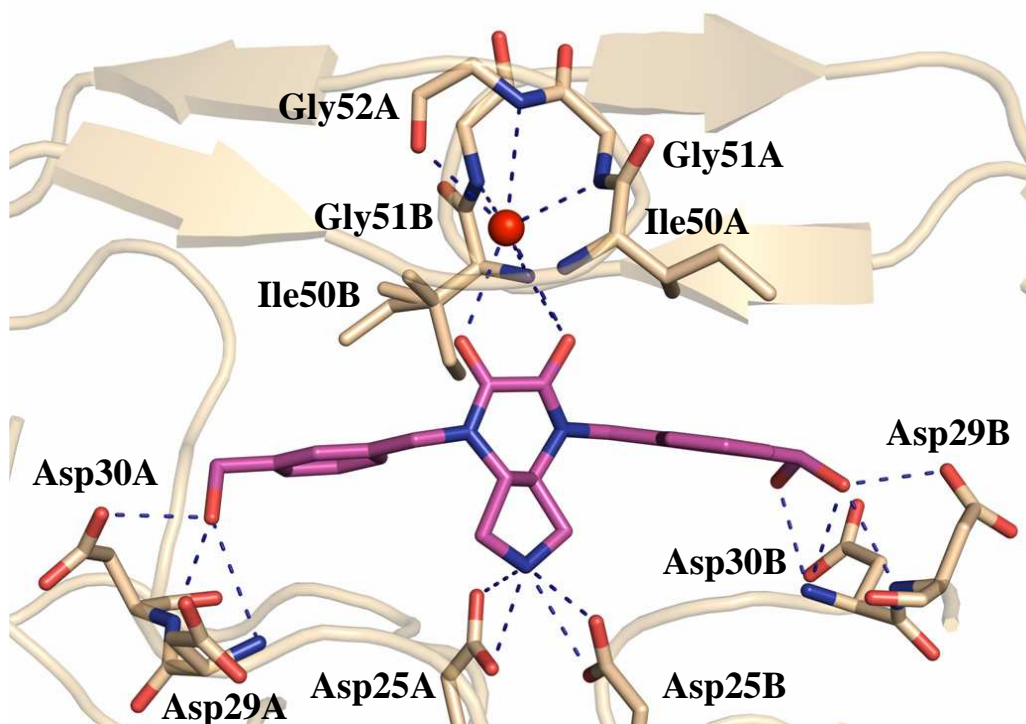


Abbildung 59: Bindungsmodus des Inhibitors NK 143 (violett)

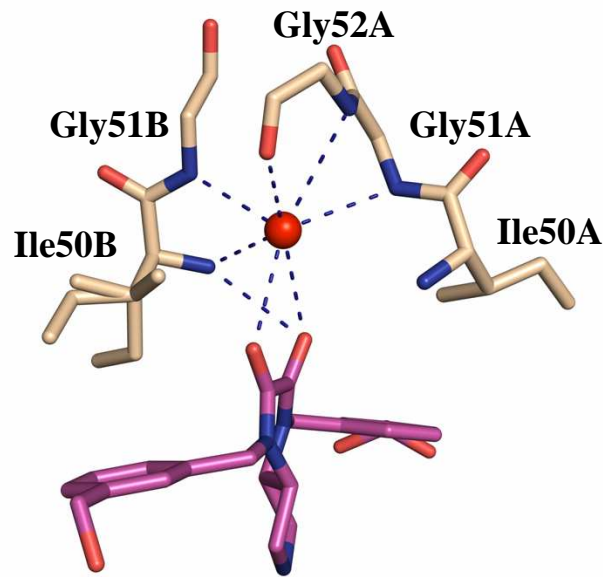


Abbildung 60: Interaktionen des Inhibitors NK 143 (violett) mit den Aminosäuren der Flap-Region der HIV-1 Protease (beige)

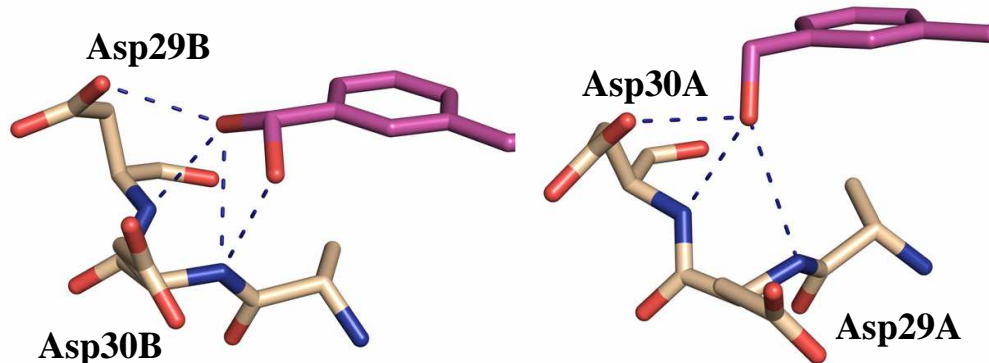


Abbildung 61: Interaktionen des Inhibitors NK 143 (violett) in der S2- Tasche (rechts) und S2'-Tasche (links) der HIV-1 Protease (beige)

Die Position der Hydroxymethylengruppen des Inhibitors NK 143 ist durch die zusätzliche Methylgruppe leicht verschieden, so dass sich auch Unterschiede in den Wechselwirkungen ergeben. Die Hydroxymethylengruppe des die S2-Tasche adressierenden Substituenten wurde in zwei Konformationen verfeinert. Liegt sie in der Konformation vor, die mit einer Besetzung von 50% verfeinert wurde, sind Interaktionen zum A-

midstickstoff des Rückgrats der Aminosäure Asp29B und einem Wassermolekül möglich. Die alternative Konformation wurde mit einer Besetzung von 33% verfeinert. Hier sind Wechselwirkungen sowohl mit den Amidstickstoffen des Rückgrats von Asp29B und Asp30B als auch mit der Seitenkette von Asp29B möglich. Zusätzliche van der Waals-Wechselwirkungen dieses Substituenten im Vergleich zum Inhibitor NK 101 werden zu den Aminosäuren Gly27B und Gly48B ausgebildet. In der S2'-Tasche liegt nur eine Konformation der Hydroxymethylengruppe vor, die sich jedoch von den in der S2-Tasche beobachteten unterscheidet. In dieser Konformation sind Wechselwirkungen zu den Amidstickstoffen des Rückgrats der Aminosäuren Asp29A und Asp30A, der Seitenkette von Asp30A und einem Wassermolekül möglich. Van der Waals-Wechselwirkungen dieses Substituenten werden vergleichbar zu dem Inhibitor NK 101 ausgebildet, jedoch zusätzlich zu der Aminosäure Gly48A. Die Interaktionen in der S2- und S2'-Tasche werden im Detail in Abbildung 61 dargestellt. Die S1- und S1'-Tasche verbleiben durch den Inhibitor unbesetzt und enthalten mehrere Wassermoleküle.

Zusammenfassung und Diskussion

Bicyclische Pyrrolidine konnten als Inhibitoren der HIV-1 Protease etabliert werden. Die Bindungsaffinität von fünf verschiedenen Derivaten zu der HIV-1 Protease konnte im Enzymassay bestätigt werden. Es gelang, vier der Inhibitoren im Komplex mit der HIV-1 Protease zu kristallisieren. Zwei Kristallstrukturen von Komplexen der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 101 und NK 143 konnten bestimmt werden. Ein Vergleich der Bindungsmodi der beiden Inhibitoren zeigt, dass beide sehr ähnlich an das Protein binden. Abweichungen im Bindungsmodus ergeben sich durch die unterschiedlichen Substituenten in meta-Position der aromatischen Ringsysteme: NK 143 besitzt im Gegensatz zu NK 101 eine zusätzliche Methylengruppe zwischen der Hydroxygruppe und dem aromatischen Ring. Zu den auch bei NK 101 beobachteten Interaktionen mit den Amidstickstoffen des Rückgrats von Asp29A und Asp30A in der S2'-Tasche kommt im Fall von NK 143 eine Wechselwirkung mit der Seitenkette von Asp30A hinzu. Jedoch stellt sich die Frage, warum diese nicht auch für den Inhibitor NK 101 möglich ist. Wie schon in Kapitel 2.3.5 beschrieben wurde, ist die Seitenkette von Asp30 in ihrer Konformation sehr flexibel und kann sich an den jeweiligen Inhibitor anpassen. Betrachtet man außerdem die Ergebnisse des Enzymassays, bei dem der Inhibitor NK 143 eine schwächere Affinität zu der HIV-1 Protease aufweist als der Inhibitor NK 101, scheint es, als ob diese zusätzliche Interaktion keinen Gewinn bedeutet. In der

S2-Tasche geht die Hydroxymethylengruppe des Inhibitors NK 143 je nach Konformation unterschiedliche Wechselwirkungen ein: In der schwächer besetzten Konformation können zusätzlich zu der Wechselwirkung mit dem Rückgrat Interaktionen zu der Seitenkette von Asp30B ausgebildet werden. Dennoch ist diese nicht die bevorzugte Konformation. Es lässt sich an dieser Stelle nicht abschließend klären, welchen Beitrag die einzelnen Interaktionen zur Bindungsaffinität der Inhibitoren leisten. Nach der Strukturaufklärung der Komplexe der HIV-1 Protease mit den Inhibitoren NK 102 und NK 150 können weitere Informationen über deren Bindungsmodi helfen, die ersten Kristallstrukturen und die K_i -Werte weiter zu interpretieren. Der Inhibitor NK 101 zeigt bisher im Enzymassay die höchste Affinität zu der HIV-1 Protease und sollte damit als Grundlage für das weitere Design verwendet werden. Eine Erweiterung der Moleküle um Substituenten, die die S1- und S1'-Tasche der HIV-1 Protease adressieren können, wäre zur Steigerung der Bindungsaffinität sinnvoll. In Kapitel 2.3.7 wird vorgestellt, wie ein *Screening* nach Fragmenten durchgeführt wurde, die zusätzlich zu dem Inhibitor NK 101 in der S1- und S1'-Tasche binden können, um neue Ideen zur Optimierung der bizyklischen Pyrrolidin-Inhibitoren zu gewinnen.

2.3.7 Verwendung von Fragmenten im strukturbasierten Design von Inhibitoren der HIV-1 Protease

Einleitung

Bizyklische Pyrrolidinderivate wurden in Kapitel 2.3.6 als neue Inhibitoren der HIV-1 Protease vorgestellt. Die bisher entwickelten Inhibitoren adressieren die S2- und S2'-Tasche des Proteins. Dabei liegt die Bindungsaffinität des stärksten Inhibitors NK 101 im einstellig mikromolaren Bereich. Die Bindetasche der HIV-1 Protease bietet weiteren Raum für die Bindung von Molekülen, wie zum Beispiel in der S1- und S1'-Tasche. Dies konnte bereits vergleichbar im Fall der dreiarmligen Pyrrolidinderivate gezeigt werden: Die von diesen Inhibitoren nicht adressierte S1-Tasche wurde im Rahmen der Kristallisation von verfügbaren kleinen Molekülen besetzt. Um die Bindungsaffinität der bizyklischen Pyrrolidinderivate zu erhöhen, können die vorliegenden Verbindungen synthetisch erweitert und weitere Bereiche der Bindetasche adressiert werden. Für das Design dieser neuen Inhibitoren ist es dabei wichtig zu berücksichtigen, welche Interaktionen im verbleibenden Teil der Bindetasche relevant sein können. Um dies zu untersuchen und um neue Ideen für die molekularen Strukturen der Inhibitoren zu generieren, wurden Fragmente als Sondenmoleküle verwendet. Diese wurden zunächst von Nina Klee im Docking ausgewählt und anschließend im Enzymassay und in Kristallisationsansätzen eingesetzt. Das Ziel dieser Arbeit sollte sein, Kristallstrukturen der HIV-1 Protease im Komplex mit einem bizyklischen Pyrrolidinderivat und verschiedenen Fragmenten zu bekommen. Die Informationen über den Bindungsmodus und die molekulare Struktur der Fragmente sollen in das Design zukünftiger Inhibitoren einfließen.

Fragmente sind kleine Moleküle, deren Molekulargewicht für gewöhnlich unter 300 Da liegt. Die Verwendung fragmentbasierter Ansätze bei der Suche nach neuen Wirkstoffen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Ursache dafür war der Wunsch nach kleineren Ausgangsmolekülen als Startstrukturen im Wirkstoffdesign, die dann systematisch zu Arzneistoffen erweitert werden können. [99-101] Die für diese Arbeit verwendete Fragmentbibliothek wurde von Tobias Craan im Rahmen einer Industriekooperation zusammengestellt. Sie besteht aus 364 Fragmenten, die anhand verschiedener Kriterien, wie zum Beispiel der Anzahl der Nichtwasserstoffatome, dem Molekulargewicht, der Anzahl von Wasserstoffdonoren und -akzeptoren und der Anzahl frei drehbarer Bindungen, ausgewählt wurden. [102]

In der Literatur findet sich bereits ein erfolgreiches Beispiel für die verwendete Methode. Zur Optimierung eines Inhibitors des humanen Hitzeschockproteins 90 (HSP90) wurde ein NMR-*Screening* mit einer Fragmentbibliothek durchgeführt. Nach der Strukturaufklärung eines ternären Komplexes von Protein, Inhibitor und einem Fragment mittels Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie konnte der Inhibitor durch Verknüpfung mit dem Fragment erfolgreich hinsichtlich der Bindungsaffinität optimiert werden. [103]

Ein Fragment-basiertes kristallographisches *Screening* gegen die HIV-1 Protease wurde bereits in der Literatur beschrieben. Dabei konnten zwei potentielle Bindestellen für Fragmente ausserhalb der Bindetasche der HIV-1 Protease durch Kristallstrukturen identifiziert werden. Es gelang jedoch nicht, die HIV-1 Protease im Komplex mit allein einem Fragment in der Bindetasche zu kristallisieren. [104] Der Versuch einer solchen Co-Kristallisation und die damit zusammenhängenden Herausforderungen sollen ebenfalls in diesem Kapitel vorgestellt und diskutiert werden.

Ergebnisse

Auswahl der Fragmente

Eine Auswahl von 59 Fragmenten aus der beschriebenen Bibliothek mit einem Molekulargewicht von maximal 170 g/mol wurde von Nina Klee für ein Docking mit dem Programm FlexX verwendet. Nach anschließender Minimierung mit dem Programm MiniMuDS wurden anhand des im Docking erhaltenen Scores und nach visueller Inspektion der Ergebnisse zehn Fragmente ausgewählt. Die Strukturformeln dieser Fragmente sind nachfolgend abgebildet. Die korrespondierenden Nummern entsprechen denen der Fragmentbibliothek.

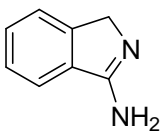
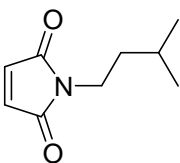
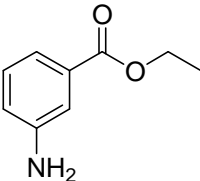
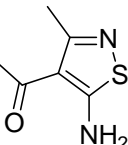
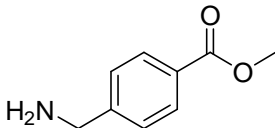
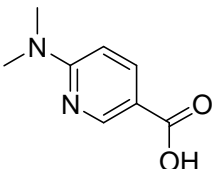
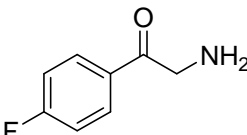
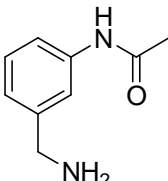
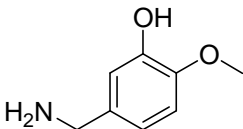
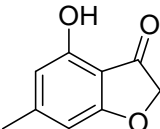
Nr. 5	Nr. 92	Nr. 115	Nr. 185
			
Nr. 211	Nr. 266	Nr. 274	Nr. 285
			
	Nr. 286	Nr. 354	
			

Tabelle 14: Strukturformeln der verwendeten Fragmente

Zur Prüfung der Identität und der Reinheit der käuflich erworbenen Fragmente wurden massenspektrometrische Untersuchungen von dem Kooperationspartner Merck KGaA durchgeführt. Die Identität des Fragmentes Nr. 92 konnte dabei nicht bestätigt werden. Die Reinheit von Fragment Nr. 286 wurde durch diese Messungen zu 10% spezifiziert. Somit konnten diese beiden Fragmente nicht für experimentelle Arbeiten verwendet werden.

Kinetik

Im Enzymassay wurde getestet, ob die Fragmente einen zusätzlichen Beitrag zur Inhibition des Inhibitors NK 101 leisten können. Der Inhibitor NK 101 wurde jeweils in einer finalen Konzentration von 10 μ M eingesetzt, was zu einer Inhibition der HIV-1 Protease von 67,3% führte. Die Fragmente wurden jeweils in einer finalen Konzentration von 1 mM verwendet. Im Fall der Verwendung von drei dieser Fragmente in Kombination mit dem Inhibitor NK 101 konnte ein zusätzlicher Effekt festgestellt werden: Die Inhibition in Anwesenheit von Fragment Nr. 115 konnte auf 81,9%, mit Fragment Nr. 266 auf 91,0% und mit Fragment Nr. 354 auf 91,5% gesteigert werden. Jedoch ergab die

Testung dieser Fragmente in Abwesenheit des Inhibitors ebenfalls eine Inhibition der HIV-1 Protease. Fragment Nr. 115 inhibierte das Protein zu 39,8%, Fragment Nr. 266 zu 64,8% und Fragment Nr. 354 zu 77,3%. Somit erschien es als wahrscheinlich, dass der beobachtete zusätzliche Effekt nicht kooperativ war, sondern durch eine individuelle Reaktion der Fragmente mit dem katalytischen Zentrum der HIV-1 Protease verursacht wurde.

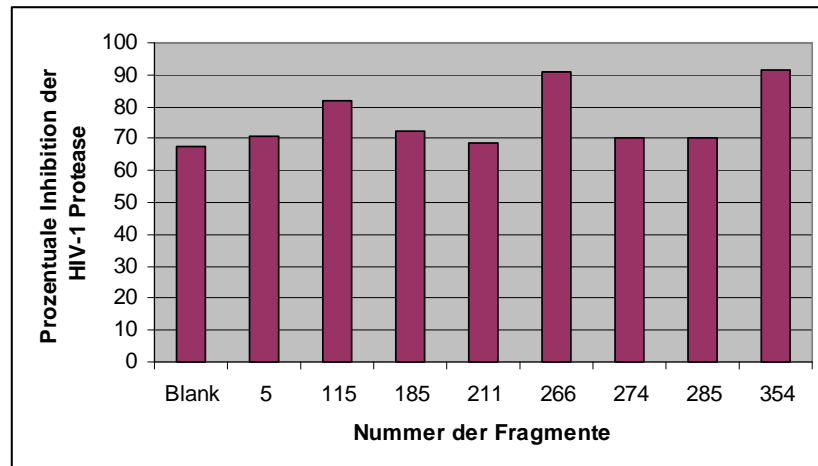


Abbildung 62: Prozentuale Inhibition der HIV-1 Protease durch die Fragmente in Anwesenheit des Inhibitors NK 101

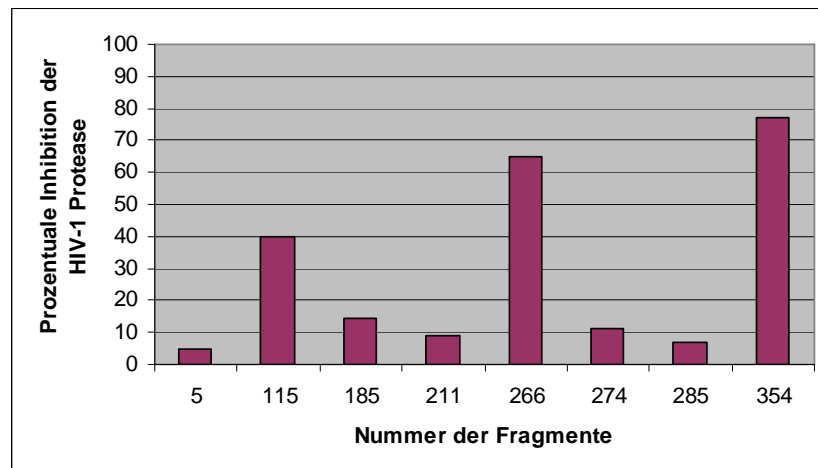


Abbildung 63: Prozentuale Inhibition der HIV-1 Protease durch die Fragmente in Abwesenheit des Inhibitors NK 101

Co-Kristallisation der HIV-1 Protease mit den Fragmenten Nr. 266 und Nr. 354

Die Fragmente Nr. 266 und Nr. 354, die im Enzymassay eine signifikante Inhibition der HIV-1 Protease auch in Abwesenheit des Inhibitors NK 101 zeigen konnten, wurden in

einer finalen Konzentration von 2mM mit dem Protein zur Co-Kristallisation angesetzt. Es wuchsen in beiden Ansätzen kleine, dünne Kristalle, die sich als sehr leicht zerbrechlich erwiesen. So gelang die Überführung in das Kryoprotektivum und das anschließende Einfrieren im flüssigen Stickstoff nur mit einem Kristall aus den Ansätzen mit Fragment Nr. 354. Es konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 2.0Å am Synchrotron BESSY II gesammelt werden. Aufgrund des verhältnismäßig geringen Diffraktionsvermögens des Kristalls, vermutlich bedingt durch seine Größe, musste dabei eine relativ hohe Belichtungszeit von 20 s pro Bild gewählt werden. Leider konnte nach einigen Zyklen der Verfeinerung des Datensatzes der in der Bindetasche nachweisbaren Differenzelektronendichte keine eindeutige molekulare Struktur zugeordnet werden. Das Fragment hatte nicht quantitativ an die Proteinmoleküle im Kristall gebunden. Somit erfolgte keine weitere Bearbeitung dieses Datensatzes.

Co-Kristallisation der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 101 in Kombination mit den Fragmenten Nr. 5 und Nr. 285

Die Fragmente Nr. 5 und Nr. 285 wurden für eine Co-Kristallisation mit der HIV-1 Protease und dem Inhibitor NK 101 verwendet. Die Methode sollte zunächst mit zwei der acht verbleibenden Fragmente getestet werden, da eine Co-Kristallisation im Vergleich zum *Soaking* sowohl zeit- als auch materialaufwendiger ist. Die finale Konzentration des Inhibitors sowie die der Fragmente in den Kristallisationsansätzen und auch später im Kryoprotektivum betrug 1mM. In den Kristallisationsansätzen wuchsen jeweils große, wohlgeformte, quaderförmige Kristalle, deren Aussehen denen der Kristalle des Komplexes der HIV-1 Protease mit den bipyklischen Pyrrolidin-Inhibitoren entsprach. Von jeweils einem Kristall aus den Ansätzen mit den beiden Fragmenten konnten Datensätze am Synchrotron BESSY II gesammelt werden. Die Auflösung des Datensatzes des Kristalls mit Fragment Nr. 5 beträgt 1.6Å, die des Datensatzes des Kristalls mit Fragment Nr. 285 1.47Å. Die Differenzelektronendichte in der Bindetasche definiert gut die Koordinaten und somit die Position des Inhibitors NK 101, jedoch konnte auch nach einigen Verfeinerungszyklen keine zusätzliche Differenzelektronendichte für das jeweilig erwartete Fragment beobachtet werden. Somit erfolgte auch keine weitere Bearbeitung dieser Datensätze.

Co-Kristallisation der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 101 und anschließendes *Soaking* von Fragmenten

Da die initialen Co-Kristallisationsexperimente, wie beschrieben, erfolglos geblieben waren, wurde nun die Methode des sogenannten *Soakings* ausprobiert. Die HIV-1 Protease wurde mit dem Inhibitor NK 101 co-kristallisiert. Die erhaltenen Kristalle wurden, wie in Kapitel 2..2.3 beschrieben, für das *Soaking* mit den acht Fragmenten verwendet. Es gab deutliche Unterschiede im Einfluss der einzelnen Fragmente auf die visuell abschätzbare Kristallqualität, so dass die finale Konzentration und die Dauer des *Soakings* individuell variiert werden mussten. Diese Parameter werden in Tabelle 15 aufgeführt.

Nummer des Fragments	5	115	185	211	266	274	285	354
Fragment-konzentration beim <i>Soaking</i>	10 mM	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM
Dauer des <i>Soakings</i>	90 min	30 min	30 min	30 min	30 min	90 min	90 min	30 min
Auflösung des Datensatzes	1.73Å	1.39Å	1.55Å	1.55Å	1.46Å	1.73Å	1.50Å	1.25Å
Differenz-elektronendichte für NK 101	+	+	+	-	+	-	+	+
Differenz-elektronendichte für das Fragment	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabelle 15: Parameter des kristallographischen Fragment-*Screenings*

Datensammlung und Strukturverfeinerung

Es konnten acht Datensätze gesammelt werden, sechs davon am an der Beamline 14.2 des Synchrotron BESSY II, zwei am *inhouse*-Röntgendiffraktometer. Die dazugehörige Auflösung der Datensätze zeigt Tabelle 15. Nach einigen Verfeinerungszyklen wurde

die Differenzelektronendichte in der Bindetasche betrachtet. In zwei Strukturen war keine Differenzelektronendichte vorhanden, die dem Inhibitor NK 101 zugeordnet werden konnte. In den verbleibenden sechs Strukturen wurde der Inhibitor durch die Differenzelektronendichte gut definiert. In sieben der acht Strukturen war keine Differenzelektronendichte vorhanden, die der molekularen Struktur der für das *Soaking* verwendeten Fragmente zugeordnet werden konnte. In einem Fall gelang es jedoch dem Fragment, in die Bindetasche vorzudringen: In der Struktur des Kristalles, der für ein *Soaking* mit dem Fragment Nr. 115 verwendet worden war, ist Differenzelektronendichte für zwei Moleküle des Fragments vorhanden. Abbildung 64 zeigt, dass die Fragmente gut durch die Differenzelektronendichte definiert werden, dabei ist die Qualität der Dichte für das Fragment in der S1-Tasche etwas höher. Die Verfeinerung dieses Datensatzes wurde somit abgeschlossen und die Koordinaten der Struktur unter dem Code 3QIH in der Proteindatenbank deponiert. Aufgrund der hohen Auflösung der Struktur von 1.39Å war eine anisotrope Verfeinerung der B-Werte möglich. Die kristallographischen Parameter, die die Daten und die Auswertung beschreiben, zeigt Tabelle 16.

Bezeichnung der Struktur	HIV-1 PR – NK 101 / Fragment 115
Datensammlung und Prozessierung	
Wellenlänge [Å]	0.91841
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszellparameter [Å,°]; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$	a = 58.0, b = 85.4 , c = 46.7 $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$
Auflösungsbereich [Å]	50.00-1.39 (1.41-1.39)
Anzahl einzigartiger Reflexe	47014 (2342)
R _{sym} [%]	6.6 (47.1)
Vollständigkeit [%]	98.8 (100.0)
Redundanz	4.4 (4.2)
I / σ	19.3 (3.0)
Matthews-Koeffizient [Å ³ /Da]	2.7
Lösungsmittelgehalt [%]	54.0
Strukturverfeinerung	
Auflösungsbereich [Å]	24.01-1.39
Anzahl der Reflexe für die Verfeinerung	44640
Anzahl der Reflexe im Testdatensatz	2339
R-Faktor [%]	15.1
Freier R-Faktor [%]	17.1
RMSD-Werte	
Bindungslängen [Å]	0.006
Bindungswinkel [°]	1.209
Durchschnittliche B-Werte	
Protein	18.0
Inhibitor	22.9

Fragment in der S1-Tasche	28.1
Fragment in der S1'-Tasche	33.8
Wasser	37.2
Weitere Liganden	21.7
Ramachandran-Plot	
Aminosäuren in bevorzugten Regionen [%]	96.8
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen [%]	3.2
Sonstiges	
Anzahl der Aminosäuren	198
Anzahl der Atome des Inhibitors	27
Anzahl der Fragmentatome	12
Anzahl der Wassermoleküle	280
Anzahl der Atome weiterer Liganden	3
PDB-Code	3QIH

Tabelle 16: Kristallographische Tabelle zu der Struktur des Komplexes der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 101 und dem Fragment Nr. 115

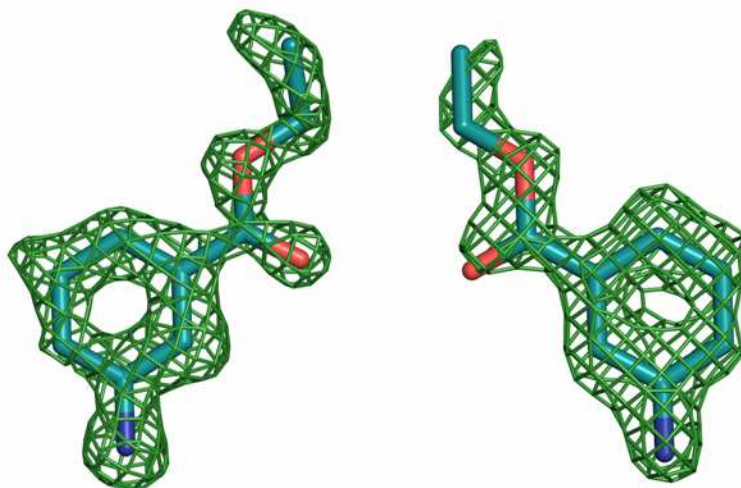


Abbildung 64: F_0-F_c -Elektronendichtekarte für die Fragmente (σ -Level: 3.0)

Links: Fragment in der S1-Tasche, rechts: Fragment in der S1'-Tasche

Bindungsmodus der Fragmente

Zwei Moleküle des Fragments Nr. 115 binden zusätzlich zu dem Inhibitor NK 101 in der Bindetasche der HIV-1 Protease. Während der Inhibitor die S2- und S2'-Tasche des Proteins adressiert, binden die Fragmentmoleküle in der S1- und S1'-Tasche, wie Abbildung 65 zeigt.

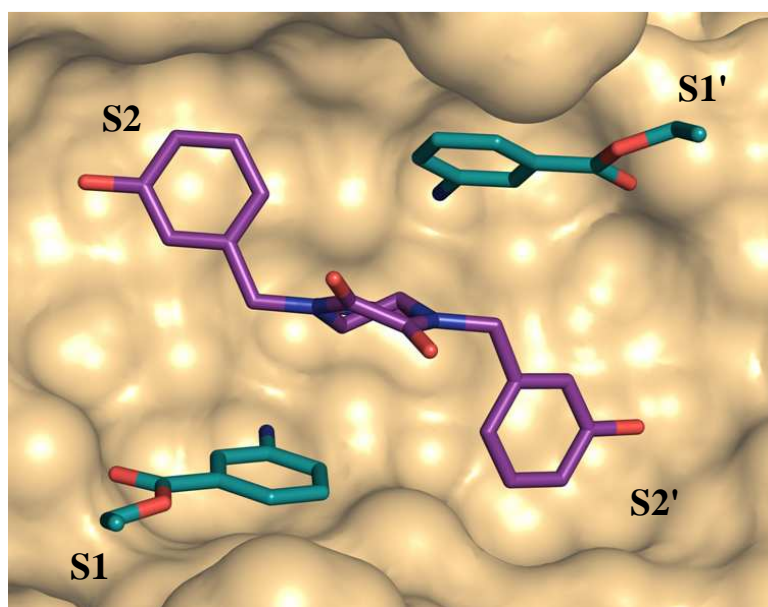


Abbildung 65: Besetzung der Subtaschen der HIV-1 Protease durch den Inhibitor NK 101 und zwei Moleküle des Fragments Nr. 115

Der Bindungsmodus im Detail ist am Beispiel des Fragments in der S1'-Tasche in Abbildung 66 gezeigt. Beide Fragmentmoleküle gehen nahezu die gleichen Interaktionen ein. Die Aminogruppe des Fragments findet Partner für potentielle Wasserstoffbrückenbindungen in den Aminosäuren Asp25B und Gly27A. Die Carboxylgruppe des Carbonsäureethylesters in meta-Position kann als Akzeptor für den Wasserstoff von Arg8B dienen. Diese Aminosäure liegt jedoch in zwei Konformationen vor, so dass diese Interaktion nicht in allen Molekülen des Kristalls ausgebildet werden kann. Die Konformation der Aminosäure Arg8, die die Wechselwirkung mit dem Fragment eingehen kann, wurde in der S1'-Tasche zu 53% und in der S1-Tasche zu 58% verfeinert.

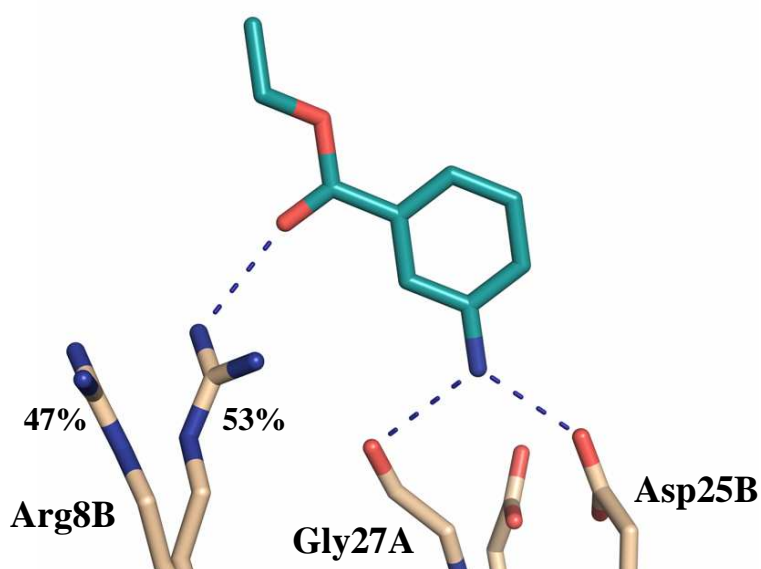


Abbildung 66: Interaktionen des Fragments (türkis) in der S1'-Tasche der HIV-1 Protease (beige)

Van der Waals-Wechselwirkungen werden zwischen den Fragmenten und den Aminosäuren Arg8, Leu23, Asp25, Gly27, Gly48, Gly49, Ile50, Phe53, Pro81, Val82 und Ile84 und auch zu dem Inhibitor NK 101 ausgebildet. In der S1'-Tasche sind zusätzliche van der Waals-Wechselwirkungen zu der Aminosäure Trp6A des symmetrieäquivalenten Moleküls möglich.

Bindungsmodus des Inhibitors NK 101

Der Inhibitor NK 101 bindet nahezu vergleichbar zu der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Struktur an die HIV-1 Protease. Während die Interaktionen zu den katalytischen Asparaten und in der S2- und S2'-Tasche erhalten geblieben sind, lässt sich jedoch ein Unterschied in der Wechselwirkung mit der Flap-Region der HIV-1 Protease feststellen. Wie

Abbildung 67 zeigt, interagieren in dieser Struktur beide Carbonylsauerstoffe des Inhibitors direkt mit den Amidstickstoffen der Aminosäuren Ile50A und Ile50B. In der zuvor beschriebenen Struktur gibt es dagegen nur eine direkte Interaktion zu Ile50B, während weitere Wechselwirkungen über ein Wassermolekül zu den Amidstickstoffen des Rückgrats von Ile50B, Gly51A und Gly51B sowie zum Carbonylsauerstoff von Gly52A vermittelt werden. Dieser Unterschied ist möglich durch einen Flip des Dipeptids Ile50A-Gly51A. Die Position der Carbonylsauerstoffe des Inhibitors NK 101 ist durch das veränderte Interaktionsmuster in den beiden Strukturen ebenfalls leicht verschieden.

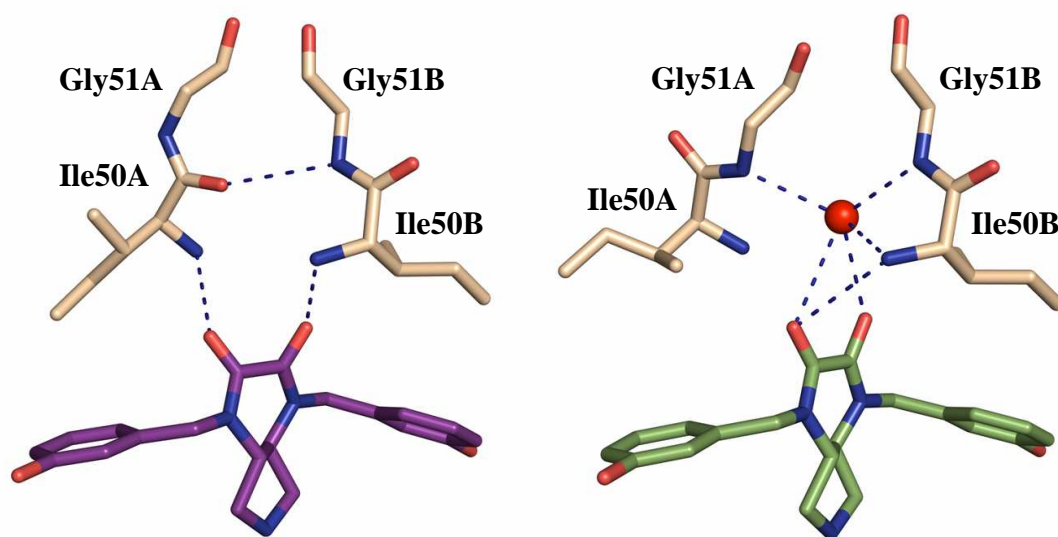


Abbildung 67: Interaktionen des Inhibitors NK 101 mit der Flap-Region der HIV-1 Protease

Links: Bindungsmodus in der Kristallstruktur mit zwei gebundenen Fragmentmolekülen

Rechts: Bindungsmodus in der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Kristallstruktur ohne Fragmentmoleküle

Zusammenfassung und Diskussion

Es wurde ein Fragment-basiertes *Screening* durchgeführt, dessen Ziel es war, Moleküle zu identifizieren, die parallel zu dem bicyklischen Pyrrolidin-Inhibitor NK 101 an die HIV-1 Protease binden können. Die im Docking ausgewählten Fragmente wurden zunächst im Enzymassay getestet. Dabei stellte sich heraus, dass einige Fragmente zwar eine Inhibition der HIV-1 Protease zeigen konnten, jedoch unabhängig vom Inhibitor NK 101. Ein kooperativer Effekt der ausgewählten Fragmente konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden.

Eine Co-Kristallisation der HIV-1 Protease mit zwei der Fragmente, die eine Inhibition im Assay zeigen konnten, führte jedoch nur zu qualitativ minderwertigen Kristallen. Trotzdem gelang es, einen Datensatz von einem dieser Kristalle zu sammeln: Jedoch

konnte die Differenzelektronendichte in der Bindetasche keiner eindeutigen Struktur zugeordnet werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass schon anhand der Kristallqualität abgeschätzt werden kann, ob eine Bindung quantitativ erfolgt ist. Eine ähnliche Beobachtung bei der Co-Kristallisation der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor KeLi 184 wurde bereits in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

Bisher ist in der Literatur keine Kristallstruktur der HIV-1 Protease im Komplex mit einem Fragment allein in der Bindetasche beschrieben. Ein solch kleines Molekül hat es schwer, mit hinreichender Affinität gleichzeitig die katalytischen Aspartate und die Flap-Region zu adressieren. Für eine erfolgreiche Kristallisation der HIV-1 Protease in den orthorhombischen und den hexagonalen Raumgruppen scheint jedoch die Stabilisierung der Flap-Region durch ein Molekül in der Bindetasche unabdingbar: Die Packung der einzelnen Moleküle im Kristall ist in dieser Form nur bei geschlossener Flap denkbar. Es wäre sicherlich möglich, eine Kristallstruktur der HIV-1 Protease im Komplex mit einem Fragment bei geöffneter Flap zu bekommen, Co-Kristallisation und *Soaking* sind als Methode beides denkbar. Eine Kristallisation in dieser Konformation erfolgte zumeist in der tetragonalen Raumgruppe $P4_12_12$ und erfordert vermutlich veränderte Kristallisationsbedingungen. Jedoch ist eine solche Kristallstruktur, bei der die Bindetasche weit geöffnet und damit sehr unterschiedlich im Verhältnis zu Komplexstrukturen mit Inhibitoren ist, somit weniger geeignet als Ausgangspunkt für das strukturbasierte Design.

Eine weitere Möglichkeit wäre, die HIV-1 Protease mit einem niedrig affinen Inhibitor zu kristallisieren und anschließend zu versuchen, den Inhibitor durch *Soaking* mit einem Fragment zu verdrängen. Dass dies möglich sein kann, zeigt das Fehlen der Differenzelektronendichte für den Inhibitor NK 101 in den Strukturen der Kristalle aus dem *Soaking* mit den Fragmenten Nr. 211 und Nr. 274. Vermutlich konnten die Fragmente in einem Teil der Moleküle im Kristall den Inhibitor erfolgreich verdrängen, jedoch selbst noch keine quantitative Bindung an die HIV-1 Protease eingehen, so dass die Differenzelektronendichte weder dem Inhibitor noch dem Fragment zugeordnet werden konnte. Eine höhere Fragmentkonzentration, eine längere Dauer des *Soakings* und das Testen weiterer geeigneter Fragmente könnten hier zum Erfolg führen.

Das ursprüngliche Ziel, eine Kristallstruktur der HIV-1 Protease im Komplex mit einem bizyklischen Pyrrolidininhibitor zusammen mit einem Fragment zu erhalten, wurde erreicht: Eines von acht verwendeten Fragmenten konnte nach einem kristallographischen *Screening* in der Bindetasche identifiziert werden. Der Bindungsmodus des Fragments

in der S1- und S1'-Tasche gibt Aufschluss über wichtige Interaktionspartner in der Bindetasche der HIV-1 Protease: Die Adressierung der Aminosäuren Arg8 und Gly27 sollte im nachfolgenden Design berücksichtigt werden. Weitere Interaktionen zu den katalytischen Aspartaten scheinen möglich. Auch das Dithiandiol-Molekül, das in einigen Kristallstrukturen der HIV-1 Protease mit den dreiarmligen Pyrrolidinderivaten in der S1-Tasche vorhanden ist, bindet an Asp25A und Gly27B.

Für die Unterschiede in den Interaktionen des Inhibitors NK 101 mit den Aminosäuren der Flap-Region in den beiden Strukturen lässt sich nach detaillierter Betrachtung der Kristallstrukturen keine nahe liegende Erklärung finden. Die Bindung der Fragmente scheint in keinem ursächlichen Zusammenhang mit dem Dipeptidflip oder der leicht veränderten Konformation des Inhibitors zu stehen. Unterschiede in der Konformation des Dipeptids Ile50-Gly51 wurden schon in weiteren Kristallstrukturen beobachtet. Dies ist zum Beispiel in Kapitel 2.3.2 beschrieben. In der Struktur des Komplexes der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 82 konnte dieses Dipeptid sogar in zwei Konformationen verfeinert werden. Während der Verfeinerung verschiedener Strukturen fiel außerdem immer wieder auf, dass die Elektronendichte in diesem Bereich qualitativ relativ schlecht ist. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Geometrie des Dipeptids sehr flexibel sein kann und sich in diesen beiden Fällen zufällig ergeben hat.

Eine direkte Verknüpfung des Inhibitors NK 101 mit einem oder zwei Molekülen des Fragments, die zu einer höheren Bindungsaffinität der bizyklischen Pyrrolidinderivate führen soll, scheint synthetisch schwierig zu sein. Jedoch umfasste dieses *Screening* nur eine kleine Auswahl an Fragmenten. Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass der methodische Ansatz auch für dieses Zielprotein funktioniert, können nun viele weitere Moleküle, aus der Fragmentbibliothek und darüber hinaus, getestet werden. Ein kristallographisches *Screening* ist verhältnismäßig zeit- und materialaufwendig. Daher wäre eine Vorauswahl mittels einer anderen Methode, wie etwa NMR oder SPR, sinnvoll. Im fluoreszenzbasierten Assay konnte die kooperative Bindung des Fragments Nr. 115 nicht festgestellt werden. Eine Kombination verschiedener Assaymethoden und der Vergleich mit den resultierenden Kristallstrukturen wären wegweisend für die Zukunft des Fragment-basierten Wirkstoffdesigns.

3 Transglutaminase 2

3.1 Einleitung

3.1.1 Zöliakie

Die Autoimmunerkrankung Zöliakie wird induziert durch die Aufnahme von Proteinen aus Getreide wie Weizen, Roggen und Gerste mit der Nahrung. Diese Proteine werden mit dem Sammelbegriff Gluten oder umgangssprachlich auch als Klebereiweiße bezeichnet und besitzen einen hohen Anteil an den Aminosäuren Prolin und Glutamin. Zöliakiepatienten entwickeln eine chronische Enteropathie und als Folge eine Abflachung der intestinalen Mukosa, so dass deren absorptive Funktion reduziert ist. Nährstoffe können somit schlechter aufgenommen werden. Die Symptome der Zöliakie sind gastrointestinale Beschwerden wie Durchfall und Erbrechen, aber auch Lethargie und Gewichtsverlust. Mit der Zeit können Patienten auch Anämien oder Osteoporose entwickeln. Das Risiko für Krebserkrankungen und damit auch die Mortalität ist erhöht. Es besteht eine genetische Prädisposition für die Entwicklung einer Zöliakie. Nahezu alle betroffenen Patienten exprimieren die Histokompatibilitätsantigene HLA-DQ2 und HLA-DQ8, die Glutenpeptide binden können.

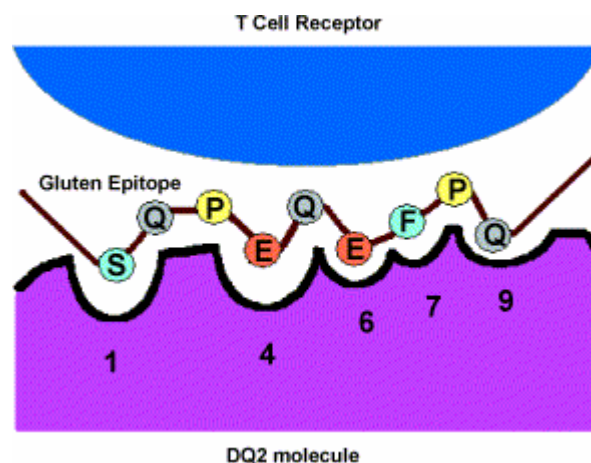


Abbildung 68: Interaktion zwischen HLA-DQ2 und einem Glutenpeptid
Die aus der Deamidierung von Glutamin resultierende negativ geladene Aminosäure Glutamat bindet in Position 4 und 6. [105]

Die resultierenden Komplexe lösen eine T-Zell-vermittelte Immunantwort und damit die beschriebene Symptomatik aus. Die beschriebenen Histokompatibilitätsantigene binden in einigen Positionen bevorzugt negativ geladene Aminosäuren, wie Abbildung 68 zeigt. Diese kommen von Natur aus nicht in signifikanter Anzahl in Gluten vor. Die Transglutaminase 2 erhöht die Affinität der Glutenpeptide zu den Histokompatibilitätsantigenen, in dem sie die Deamidierung von Glutamin zu negativ geladenem Glutamat katalysiert. [105-107]

Nach ihrer Identifizierung als Autoantigen [108] wird rekombinant hergestellte Transglutaminase 2 nun in enzymbasierten Tests zur Diagnose der Zöliakie eingesetzt. Die Prävalenz der Krankheit in der Weltbevölkerung wird auf 1% bis 2% geschätzt, wobei geographische und ethnische Unterschiede bestehen. [106] Ein Ausschluss von Gluten in der Nahrung führt zur Remission der pathologischen Veränderungen der Darmschleimhaut und der beschriebenen Symptome. Jedoch bedeutet eine glutenfreie Diät für die Patienten eine große Einschränkung der Lebensqualität, da eine Vielzahl von Nahrungsmitteln Gluten enthalten. Dennoch ist sie momentan alternativlos, da keine Therapeutika zur Behandlung der Zöliakie zur Verfügung stehen. Es gibt jedoch vielversprechende Ansätze zur Entwicklung einer Therapie. Inhibitoren der Transglutaminase 2, wie in dieser Arbeit beschrieben, könnten bei einem Einsatz als Arzneistoff die Affinität der Glutenpeptide zu den beschriebenen Histokompatibilitätsantigenen reduzieren. [109] Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von oral applizierbaren Enzymen zur Spaltung des Glutens in unschädliche Bestandteile. [110]

3.1.2 Die Transglutaminase 2

Die Familie der Transglutaminasen

Transglutaminasen katalysieren calciumabhängig die posttranslationale Modifizierung von Proteinen durch Transamidierung und Deamidierung. Sie kommen in einer Vielzahl von Organismen vor, darunter Pflanzen, Säugetiere und auch Mikroorganismen. Das humane Genom enthält neun für Transglutaminasen codierende Gene. Die Funktion und das Vorkommen der daraus resultierenden Proteine ist in Tabelle 17 dargestellt. Es handelt sich jeweils um relativ große Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 70 kDa und 90 kDa.

Drei der humanen Transglutaminasen sind bisher strukturell charakterisiert worden: Die Transglutaminase 2, die Transglutaminase 3 und der Blutgerinnungsfaktor XIII. Es be-

steht eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen den drei Proteinen, die aus jeweils vier Domänen bestehen. [111-113]

Protein	Funktion	Vorkommen	PDB-Codes der Kristallstrukturen
Transglutaminase 1	Keratinozyten-Differenzierung	Membrangebunden in Keratinozyten	-
Transglutaminase 2	Apoptose, Zelladhäsion, Matrixstabilisierung, Signaltransduktion	In zahlreichen Geweben verbreitet; intra- und extrazellulär, membrangebunden	1KV3[114], 3LY6 [115], 2Q3Z [6], 3S3J, 3S3P, 3S3S, 2XZZ [116]
Transglutaminase 3	Keratinozyten-Differenzierung	Haarfollikel, Epidermis, Gehirn	1NUD, 1NUF, 1NUG [117], 1L9M, 1L9N [118]
Transglutaminase 4	Reproduktion	Prostata	-
Transglutaminase 5	Keratinozyten-Differenzierung	Vorhaut, Skelettmuskulatur	-
Transglutaminase 6	unbekannt	Hoden, Lunge	-
Transglutaminase 7	unbekannt	Ubiquitär, aber vor allem in Hoden und Lunge	-
Faktor XIII	Blutgerinnung, Wundheilung, Knochenwachstum	Thrombozyten, Plazenta, Makrophagen, Gelenkflüssigkeit, Knorpel,	1FIE [119], 1GGY, 1GGU, 1QRK [120], 1GGT [121], 1F13 [122], 1EX0, 1EVU [123]
Erythrozyten-Band 4.2	Hauptbestandteil des Membranskeletts der Erythrozyten; keine katalytische Aktivität	Erythrozyten, Knochenmark, Milz	-

Tabelle 17: Funktion und Vorkommen der humanen Transglutaminasen [113]

Die Struktur der Transglutaminase 3 ist wie die der Transglutaminase 2 bereits in einer aktiven, für Substrate oder Inhibitoren zugänglichen Konformation beschrieben worden. Diese wird jedoch nicht durch eine Veränderung der relativen Lage der Domänen zueinander, sondern durch eine proteolytische Spaltung zwischen der katalytischen Domäne und der β -Barrel-Domäne 1 herbeigeführt. [118]

Funktion und Vorkommen der Transglutaminase 2

Die Transglutaminase 2, auch als Gewebetransglutaminase bezeichnet, ist hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, kommt aber auch im Zellkern, an Zellmembranen und extrazellulär vor. Intrazellulär ist die enzymatische Aktivität des Proteins durch die Anwesenheit von Nukleotiden wie zum Beispiel GDP reduziert. Hier fungiert die Transglutaminase 2 auch als GTPase, ATPase, Proteinkinase und Proteindisulfid-Isomerase. Durch ihre Multifunktionalität ist sie an zahlreichen physiologischen Prozessen wie der Apoptose, der Wundheilung, der Matrixstabilisierung und der Signaltransduktion beteiligt. Jedoch ist die Transglutaminase 2 auch in pathologische Mechanismen involviert. Ihr wird unter anderem eine Rolle bei der Entstehung des Katarakts, von Tumorerkrankungen, atherosklerotischen Plaques, neurodegenerativen Erkrankungen, darunter Chorea Huntington und Morbus Alzheimer, und eben der Zöliakie zugeschrieben. [113, 124]

Die Struktur der Transglutaminase 2

Die Transglutaminase 2 hat ein Molekulargewicht von 78 kDa und besteht aus vier verschiedenen Domänen: Der N-terminalen β -Sandwich-Domäne (Aminosäuren 1 – 139), der katalytischen Domäne (Aminosäuren 140 – 454) und zwei C-terminalen β -Barrel-Domänen (Aminosäuren 479 – 585 sowie 586 – 687). In der katalytischen Domäne ist die katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Cys 277, His 335 und Asp 358, lokalisiert. [125] Die Transglutaminase 2 kann verschiedene Konformationen einnehmen, insbesondere bedingt durch Änderung der relativen Lage der Domänen zueinander, wie Abbildung 69 zeigt. In der geschlossenen Konformation ist der Zugang zum aktiven Zentrum durch die β -Barrel-Domäne 1 blockiert. Die Aminosäure Tyr 516 interagiert über die Hydroxygruppe mit der negativ polarisierten Thiolgruppe des katalytisch aktiven Cys 277. Stabilisiert wird diese Konformation, die im nachfolgenden Text auch als inaktive Konformation bezeichnet wird, durch die Bindung von GDP, GTP oder ATP sowohl an die katalytische als auch an die β -Barrel-Domäne 1. [114, 115] Im Zuge der Aktivierung des Proteins, die durch Calciumionen induziert wird, findet mit Hilfe einer

flexiblen Schleife eine Rotation der beiden β -Barrel-Domänen statt, so dass das aktive Zentrum zugänglich wird. Dies konnte bereits durch Kleinwinkelstreuungsexperimente gezeigt werden. [126] Durch die Komplexierung des Proteins mit kovalenten Inhibitoren gelang es, die Transglutaminase 2 in einer offenen, auch als aktiv bezeichneten, Konformation zu stabilisieren und strukturell zu charakterisieren. [6]

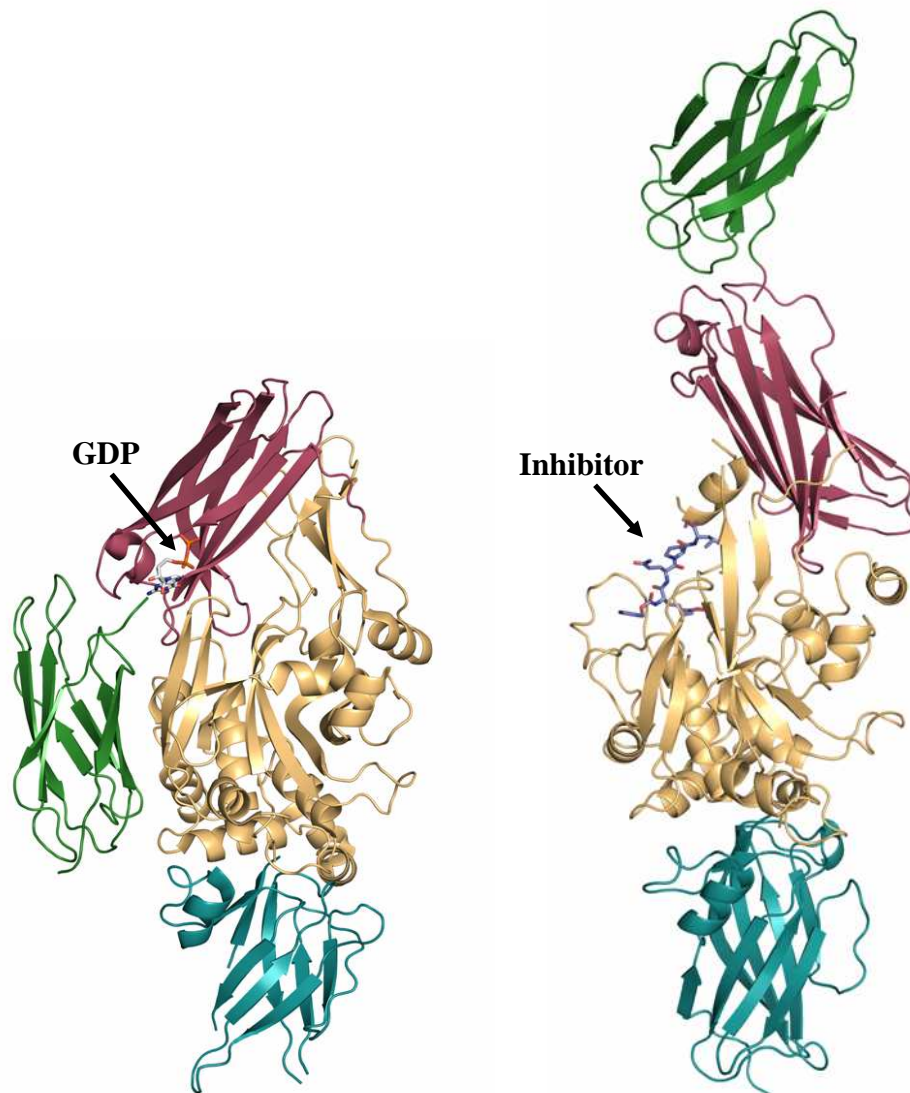


Abbildung 69: Die Transglutaminase 2 in der geschlossenen Konformation im Komplex mit GDP (links, PDB-Code 1KV3 [114]) und in der offenen Konformation im Komplex mit einem kovalent gebundenen Inhibitor (rechts, PDB-Code 2Q3Z [6])

Die β -Sandwich-Domäne ist in blau, die katalytische Domäne in gold und die β -Barrel-Domänen sind in rot und grün dargestellt.

Abbildung 69 zeigt die Transglutaminase 2 in der geschlossenen sowie in der offenen Konformation im Komplex mit einem Inhibitor. Ungewöhnlich ist hier das Ausmaß des Unterschieds zwischen den beiden Konformationen. Ausgehend von einer kompakten

Anordnung der vier Domänen im geschlossenen Zustand klappt das Protein im Zuge der Aktivierung zu einer langgestreckten, weit geöffneten Konformation aus, die durch den Inhibitor stabilisiert wird. Einige Aminosäuren verändern dabei ihre Position um nahezu 120Å. [127]

Der katalytische Mechanismus der Transglutaminase 2

Die Transglutaminase 2 katalysiert die Transamidierung und die Deamidierung von proteingebundenen Glutamin, wie Abbildung 70 zeigt. Im ersten Reaktionsschritt wird der positiv polarisierte Kohlenstoff des Carboxamids der Aminosäureseitenkette von der Thiolgruppe des katalytisch aktiven Cysteins 277 der Transglutaminase 2 angegriffen. Dies befindet sich in dem so genannten katalytischen Tunnel, während das Substrat größtenteils an die Oberfläche des Proteins bindet. Ein Thioester-Intermediat wird gebildet und Ammoniak wird freigesetzt. In der Transamidierungsreaktion wird der Thioester von einem nukleophilen primären Amin attackiert, zum Beispiel von einem proteingebundenen Lysin.

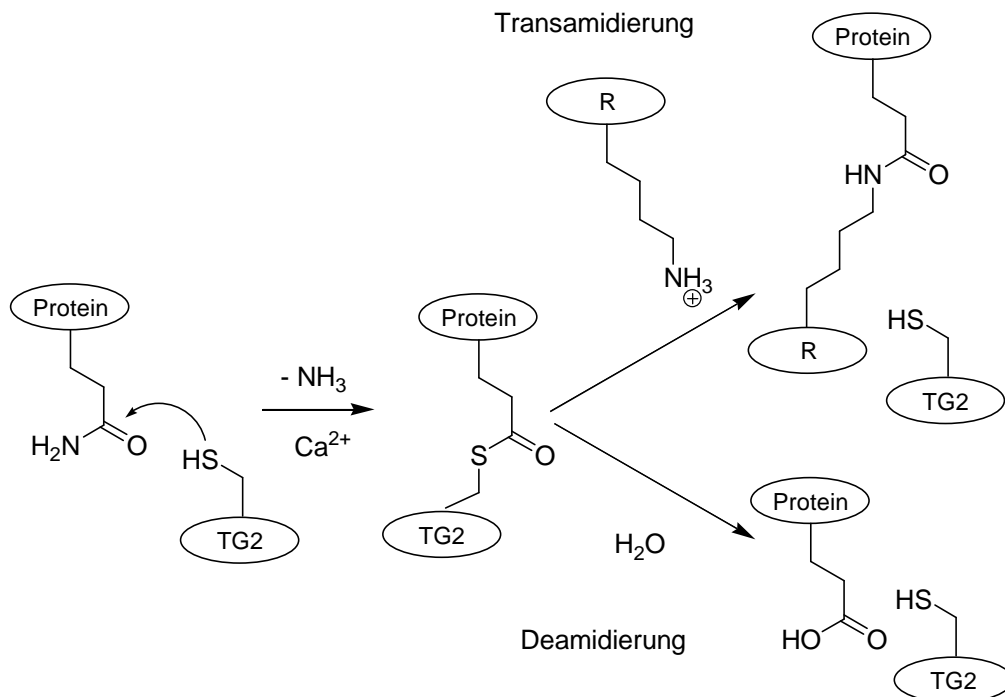


Abbildung 70: Katalytischer Mechanismus der Transglutaminase 2 [128]

R = Protein oder kleines Molekül

Dieses wird vermutlich über die andere Seite des katalytischen Tunnels gebunden, resultierend in einer Isopeptidbindung zwischen der Seitenkette des Glutamins und dem

primären Amin. In neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer spielt die Transamidierungsaktivität der Transglutaminase 2 eine Rolle. In der Pathogenese der Zöliakie ist jedoch die Deamidierung der Glutenpeptide zur Erhöhung der Affinität zu ihrem Rezeptor entscheidend. Hier agiert Wasser als Nukleophil, so dass Glutamin in Glutamat umgewandelt wird. [6, 124, 128]

Inhibitoren der Transglutaminase 2

Die Inhibitoren der Transglutaminase 2 können anhand ihres Bindungsmechanismus in drei Klassen eingeteilt werden: Kompetitive Amin-basierte Inhibitoren, reversibel bindende Inhibitoren und irreversibel bindende Inhibitoren.

Kompetitive Amin-basierte Inhibitoren bestehen aus einem primären Amin, welches an eine aliphatische unverzweigte Kohlenstoffkette aus vier bis fünf gesättigten Kohlenstoffatomen gebunden ist. Die Inhibitoren werden bei der Transamidierungsreaktion der Transglutaminase 2 anstelle des natürlichen Amin-Substrates über eine Isopeptidbindung an das Glutamin-Substrat gebunden. Abbildung 71 zeigt den Inhibitor Putrescin als Vertreter dieser Klasse.

Nukleotide wie GTP, GDP und ATP inhibieren die Transglutaminase 2 reversibel über einen allosterischen Mechanismus. Durch ihre Bindung sowohl an die katalytische Domäne als auch an die β -Barrel-Domäne 1 stabilisieren sie das Protein in der geschlossenen Konformation und verhindern so den Zugang der Substrate zum aktiven Zentrum. Weitere Inhibitoren, die vermutlich an der gleichen Position wie die Nukleotide binden, wurden beschrieben. Auch Zinkionen können die Transglutaminase 2 durch Verdrängung der an der Aktivierung beteiligten Calciumionen reversibel inhibieren.

Irreversible Inhibitoren binden kovalent an das aktive Zentrum der Transglutaminase 2 und verhindern so die Umsetzung der Substrate. Sie verfügen über eine funktionelle Gruppe, die von einem nukleophilen Atom wie dem negativ polarisierten Schwefel des Cys 277 angegriffen werden kann. Der strukturell einfachste Vertreter dieser Klasse ist Iodoacetamid, welches nach Abgang von Iodid eine Thioetherverbindung mit der Transglutaminase 2 ausbildet. Iodoacetamid ist hoch reaktiv, jedoch aufgrund seiner geringen Molekülgröße wenig selektiv. Die Gruppe der 3-Halo-4,5-dihydroisoxazole basiert auf dem Glutamin-Isoster Acivicin. Hier ist die halogenierte Kopfgruppe über Peptidbindungen mit einem aromatischen Rest verknüpft, der für die Selektivität gegenüber der Transglutaminase 2 entscheidend ist. Diese Inhibitoren weisen eine gute Bioverfügbarkeit und geringe Toxizität auf, sind jedoch bei physiologischem pH-Wert

schlecht löslich. Basierend auf Substraten der Transglutaminase 2 wurden peptidomimetische Inhibitoren mit verschiedenen elektrophilen Kopfgruppen in der Position des Glutamins entwickelt. Beispiele für diese Kopfgruppen sind α,β -ungesättigte Amide, Epoxide, 1,2,4-Thiadiazole und die in dieser Arbeit beschriebenen Diazoketone und Michael-Akzeptoren. Abbildung 71 zeigt beispielhaft den im Komplex mit der Transglutaminase 2 kristallisierten Inhibitor der Arbeitsgruppe von Prof. Khosla. [6, 128-132]

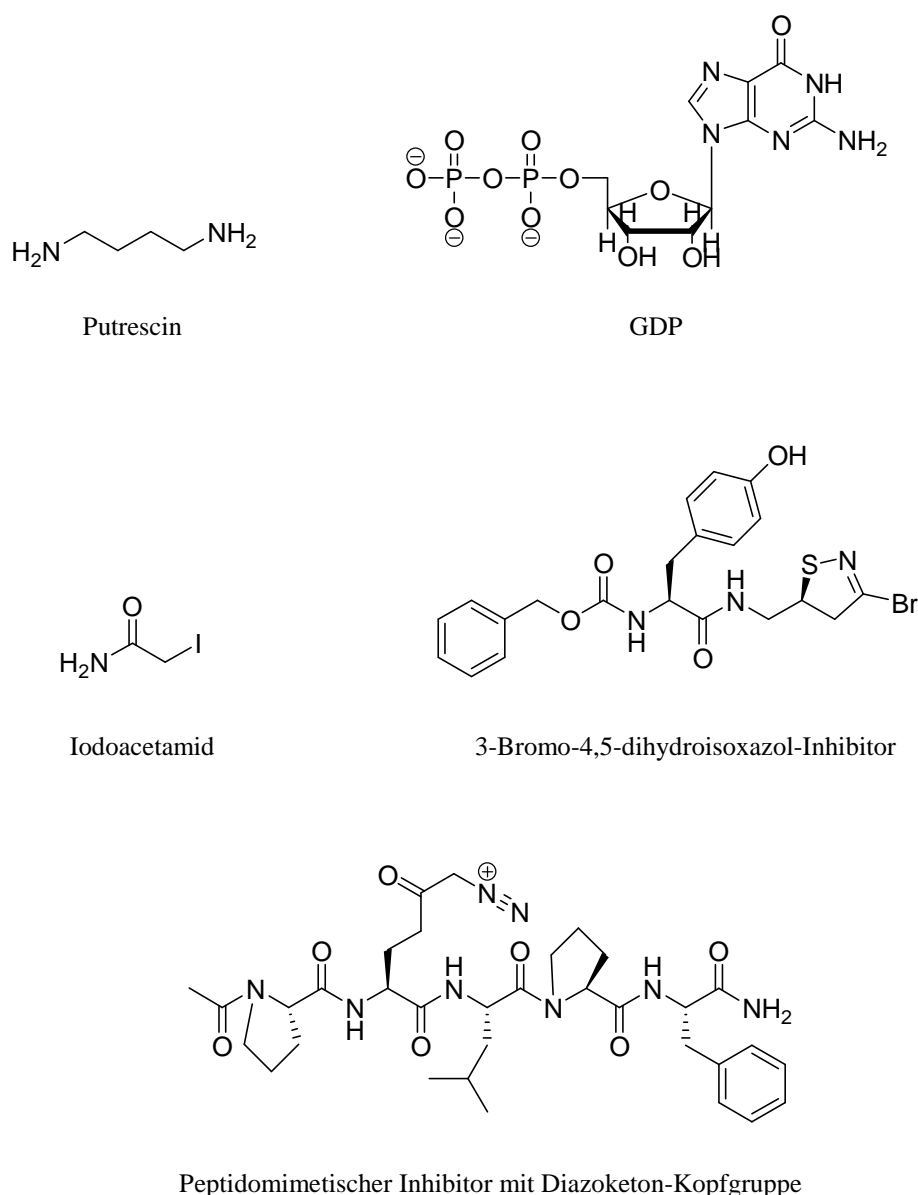


Abb. 71: Inhibitoren der Transglutaminase 2 [6, 128]

Die Transglutaminase 2 als Zielstruktur im Wirkstoffdesign

Die Kristallstruktur der Transglutaminase 2 in der aktiven Konformation wurde kürzlich erstmals bestimmt und schuf die Grundlage für das strukturbasierte Wirkstoffdesign von Inhibitoren der Transglutaminase 2. [6] In dieser Arbeit wird im folgenden beschrieben, wie die Kristallisation mit weiteren Komplexen des Proteins mit kovalent gebundenen Inhibitoren reproduziert und drei weitere Kristallstrukturen bestimmt werden konnten. Trotzdem kann die Transglutaminase 2 noch nicht als etabliertes Zielprotein im strukturbasierten Wirkstoffdesign betrachtet werden. Da die Kristallisation stark inhibitorabhängig zu sein scheint, sind dafür noch einige Herausforderungen zu meistern. Mögliche Lösungsansätze werden in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Inhibitoren der Transglutaminase 2 sind potentielle Arzneistoffe für eine Vielzahl von Erkrankungen. Sie könnten nicht nur zur Erhöhung der Lebensqualität von Zöliakiepatienten sondern auch zur Therapie schwerwiegender Krankheiten wie Morbus Alzheimer und Chorea Huntington eingesetzt werden. Dass viele physiologische Aufgaben der Transglutaminase 2 unabhängig von ihrer Trans- und Deamidierungsaktivität sind, ist vorteilhaft in Bezug auf zu erwartende Nebenwirkungen. Jedoch muss die Bindung eines zur Therapie eingesetzten Inhibitors der Transglutaminase 2 auch ausreichend selektiv gegenüber anderen Transglutaminasen, insbesondere dem Faktor XIII, und auch Cysteinproteasen erfolgen.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Verwendete Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Fluka und Merck erworben. Die Firma ZEDIRA GmbH, Darmstadt, die in diesem Projekt als Kooperationspartner fungierte, stellte das gesamte Proteinmaterial sowie die Inhibitoren zur Verfügung. Das Protein wurde vorwiegend in *E. coli* – Zellen exprimiert, teils wurden jedoch auch Insektenzellen genutzt.

3.2.2 Kristallisation der Transglutaminase 2

In den Kristallisationsansätzen wurden der Transglutaminase 2 – Wildtyp, eine C277S-Mutante der Transglutaminase 2 sowie Komplexe des Transglutaminase 2 - Wildtyps mit verschiedenen, kovalent gebundenen Inhibitoren eingesetzt. Die Kristallisation erfolgte mittels der Methode der Dampfdiffusion am sitzenden Tropfen (*Sitting Drop*). Tabelle 18 zeigt die eingesetzte Konzentration des Proteins sowie die im Reservoir verwendeten Kristallisationslösungen und die Temperatur, bei der die Ansätze hergestellt und aufbewahrt wurden. Als Lösungsmittel wurde, sofern nicht anders beschrieben, mittels Ionenaustausch demineralisiertes Wasser verwendet.

Es wurde jeweils ein Volumen von 1 ml Kristallisationslösung im Reservoir eingesetzt. Ein Tropfen setzte sich aus jeweils 1 µl der Proteinlösung und 1 µl der Kristallisationslösung zusammen. Zur Kristallisation des Transglutaminase 2 – Wildtyps und, bei Verwendung der gleichen Kristallisationsbedingungen, der Mutante C277S wurde nach der Entnahme von 1 µl Kristallisationslösung aus dem Reservoir zur Bildung des Tropfens ein Volumen von 200 µl Glycerol zu der Reservoirolösung gegeben. Die Kristallisationsansätze des Transglutaminase 2 – Wildtyps und der Mutante C277S erfolgten zum Teil unter Zugabe von GDP oder Calciumchlorid, beides wurde zu einer finalen Konzentration von 10 mM zu der Proteinlösung gegeben.

Zur Optimierung der Kristalle wurden die Methoden des so genannten *Streak-Seedings* und des *Macro-Seedings* durchgeführt. Beim *Streak-Seeding* wurden mit Hilfe eines Pferdehaars Mikrokristalle der Transglutaminase 2 in einen neuen Kristallisationsansatz mit verringerter Präzipitankonzentration eingebracht. Für das *Macro-Seeding* wurden die größten spontan gewachsenen Kristalle der Transglutaminase 2 nach einem Wasch-

schritt in einen neuen Kristallisationsansatz überführt, in dem ebenfalls eine niedrigere Präzipitanskonzentration als zuvor verwendet vorlag.

Protein	Konzentration der Proteinlösung	Zusammensetzung der Kristallisationslösung	Temperatur
Transglutaminase 2 - Wildtyp (+ / - GDP)	1. 15 mg / ml (E. coli) 2. 9 mg / ml (Insektenzellen)	50 mM MES pH 6.6 50 mM Magnesiumchlorid 5 mM DTT 200 – 500 mM Natriumchlorid 5 – 10% PEG 3350 [114]	5°C
Transglutaminase 2 - Mutante C277S 1. + GDP 2. + Ca ²⁺	9 mg / ml (Insektenzellen)	1. wie Transglutaminase 2 – Wildtyp 2. 100 mM HEPES pH 7,25 0,75 – 2 M Ammoniumsulfat	5°C
Komplexe des Transglutaminase 2 - Wildtyps mit kovalent gebundenen Inhibitoren	separat beschrieben	100 mM HEPES pH 6,75 – pH 7,50 1,0 – 2,9 M Ammoniumsulfat	16 – 18°C

Tabelle 18: Übersicht über die Kristallisationsbedingungen der Transglutaminase 2

Die massenspektrometrische Untersuchung eines Komplexes der Transglutaminase 2 mit einem kovalent gebundenen Inhibitor zur Vorbereitung der Kristallisation wurden von Dr. Uwe Linne am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

3.2.3 Screening von Kristallisationsbedingungen

Der Kristallisationsroboter Cartesian MicrosysTM SQ 4000 wurde verwendet, um eine Vielzahl von Kristallisationsbedingungen für die C277S-Mutante und die Komplexe der Transglutaminase 2 mit kovalent gebundenen Inhibitoren zu testen. Dabei wurden die von der Firma Qiagen zusammengestellten *Screening*-Lösungen Classics, Classics

Light, Cryos, JCSG+, PACT, Anions, MBC I und MBC II verwendet. Jeder Screen umfasste dabei 96 verschiedene Kristallisationsbedingungen. Wenn nicht anders beschrieben, kamen bei jedem Ansatz alle *Screening*-Lösungen zum Einsatz, insgesamt wurden also jeweils 768 Bedingungen getestet. Das Volumen der Kristallisationslösung im Reservoir betrug 80 μ l. Der Kristallisationsroboter entnahm daraus ein Volumen von 300 nl und fügte dieses mit dem gleichen Volumen der Proteinlösung zu einem sitzenden Tropfen zusammen. Die Kristallisationsansätze wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss wurden die Kristallisationsplatten bei 16°C – 18°C aufbewahrt.

3.2.4 Röntgenstrukturanalyse und Strukturverfeinerung

Datensammlung und Prozessierung

Zur Vorbereitung auf die Datensammlung wurden die Proteinkristalle in eine Lösung mit dem Kryoprotektivum Glycerol überführt. Diese Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

Kryolösung für Kristalle des Transglutaminase 2 – Wildtyps: 50 mM HEPES pH 7, 5 mM Magnesiumchlorid, 200 mM Natriumchlorid, 20% PEG 3350, 30% Glycerol

Kryolösung für Kristalle der Komplexe des Transglutaminase 2 – Wildtyps mit kovalent gebundenen Inhibitoren: 75% Reservoirlösung, 25 % Glycerol

Anschließend wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Datensammlung erfolgte ebenfalls bei 100 K. Das Streuvermögen der Kristalle wurde am *inhouse*-Röntgendiffraktometer mit der Röntgenröhre I μ S der Firma Incoatec und einem mar345-Detektor getestet. Die Datensätze von Kristallen der Komplexe des Transglutaminase 2 – Wildtyps mit kovalent gebundenen Inhibitoren wurden mit Hilfe von Synchrotronstrahlung an der Beamline 14.2 des Synchrotron BESSY II, Berlin, aufgenommen. Die gesammelten Daten wurden mit dem Programmpaket HKL 2000 [62] prozessiert und skaliert.

Strukturbestimmung und Verfeinerung

Die Strukturbestimmung und Verfeinerung erfolgte weitgehend wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Als Modell für den Molekularen Ersatz wurden die Koordinaten der Struktur mit dem PDB-Code 2Q3Z [6] verwendet. Jeweils 5% der Daten wurden für die Berechnung des freien R-Wertes genutzt.

Nach dem Einbau der an das Protein bindenden Liganden wurde der kovalente Zusammenschluss aus den Liganden mit der Aminosäure Cys 277 als so genannte unnatürliche Aminosäure definiert. Geometrische *Restraints* für die Verfeinerung der unnatürlichen Aminosäure wurden mit dem in PHENIX implementierten Programm eLBOW [133] erzeugt und in den weiteren Verfeinerungsschritten verwendet. Die Analyse der Sekundärstrukturelemente erfolgte mit dem Programm promotif. [134]

3.3 Ergebnisse und Diskussion

Einleitung

Zu Beginn dieser Arbeit war in der Proteindatenbank lediglich eine Kristallstruktur der Transglutaminase 2 verfügbar, die das Protein in seiner inaktiven, geschlossenen Konformation zeigte. [114] Zunächst wurde daher versucht, die Kristallisation des Transglutaminase 2 – Wildtyps unter den beschriebenen Bedingungen nachzustellen. Im Anschluss erfolgten dann weitreichende Bemühungen, die Transglutaminase 2 in der aktiven, offenen Konformation zu kristallisieren. Um zu verhindern, dass sich die Proteinkomplexe durch Transamidierung in der Lösung selbst miteinander vernetzen und es somit nicht mehr zu einem geordneten Kristallwachstum kommen kann, wurde zunächst eine C277S-Mutante der Transglutaminase 2 eingesetzt. Das katalytisch aktive Cystein 277 wurde durch Serin ersetzt. Desweiteren wurden Komplexe der Transglutaminase 2 mit einer Vielzahl von Inhibitoren, die von der ZEDIRA GmbH synthetisiert wurden, für die Kristallisation verwendet. Die Sequenzen der natürlichen Substrate der Transglutaminase 2 dienten als Basis für das Design der eingesetzten Inhibitoren. Sie gehen über ihre so genannte Kopfgruppe eine kovalente Bindung zum katalytisch aktiven Cystein 277 ein, welches höchstwahrscheinlich negativ geladen vorliegt. Als Kopfgruppe findet entweder ein Diazoketon oder ein Michael-Akzeptor Verwendung. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen den Mechanismus der Bindung der Inhibitoren an die Transglutaminase 2.

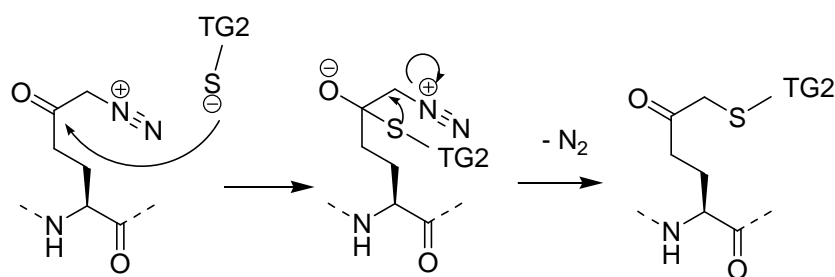


Abbildung 72: Mechanismus der Bindung der Inhibitoren mit einem Diazoketon als Kopfgruppe an die Transglutaminase 2

Bei der Bindung der Inhibitoren mit einer Diazoketonkopfgruppe entweicht molekularer Stickstoff in Folge der kovalenten Verknüpfung. Der Angriffspunkt der Transglutaminase 2 weist die gleiche Distanz zum C α -Atom der Hauptkette des Inhibitors auf wie bei der Umsetzung des natürlichen Substrats Glutamin.

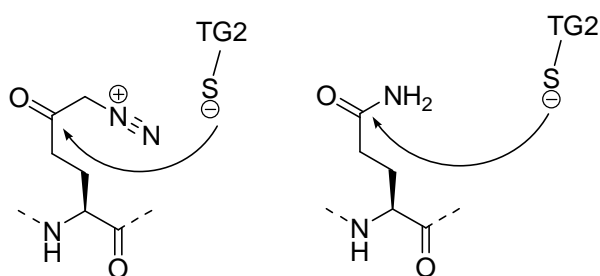


Abbildung 73: Analogie der Bindung der Transglutaminase 2 an den Inhibitor und an das natürliche Substrat Glutamin

Die Inhibitoren mit mit einem Michael-Akzeptor als Kopfgruppe binden über eine Michael-Addition an die Transglutaminase 2.

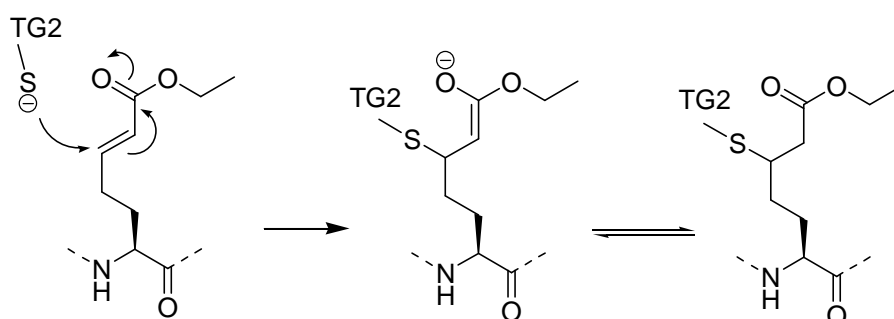


Abbildung 74: Mechanismus der Bindung der Inhibitoren mit einem Michael-Akzeptor als Kopfgruppe an die Transglutaminase 2

Das entstehende Stereozentrum nimmt entweder eine R- oder eine S-Konfiguration ein. Der kovalent gebundene Inhibitor kann als Keton oder Enol vorliegen.

Die eingesetzten Inhibitoren wurden von der ZEDIRA GmbH in einem fluoreszenzbasierten Assay vermessen. Die IC_{50} -Werte aller Inhibitoren liegen im niedrigstelligen nanomolaren Bereich. Das Ziel dieser Arbeit sollte es sein, den Bindungsmodus der Inhibitoren aufzuklären, um die gewonnenen Informationen für das weitere Inhibitor-design zu nutzen. Insbesondere der peptidomimetische Charakter der Verbindungen sollte reduziert werden. Schlussendlich sollte ein affines, als Arzneistoff geeignetes Molekül zur Verfügung stehen.

Ergebnisse

Kristallisation des Transglutaminase 2 – Wildtyps

Zur Kristallisation des Transglutaminase 2 – Wildtyps wurden Bedingungen verwendet, die, wie in der Literatur beschrieben, bereits erfolgreich zu einem Kristallwachstum und anschließender Aufklärung der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 führten [114]. Die Verwendung von GDP, das in der Kristallstruktur an das Protein bindet, sollte zu einer Stabilisierung des Proteins in der inaktiven Konformation führen. Anfangs kam es innerhalb von 24 h zum Wachstum nadelförmiger Kristalle. Vergleichbare Kristalle waren zuvor von Jark Böttcher bereits am *inhouse*-Röntgendiffraktometer getestet worden und zeigten ein geringes, für eine Datensammlung nicht ausreichendes Streuvermögen mit einer maximalen Auflösung von ca. 8Å. Daher wurde versucht, die Kristallqualität mittels *Seeding*-Methoden zu optimieren. Das *Streak-Seeding* sollte helfen, die Prozesse der initialen Kristallisation und das Kristallwachstum zu entkoppeln und die Kristallisationsbedingungen im Hinblick auf das Kristallwachstum zu verbessern. Die Kristalle wuchsen daraufhin langsamer heran. Auch die Kristallform veränderte sich teilweise: Einige Kristalle wiesen nun einen quaderförmigen Habitus auf. Diese wurden mit Hilfe des *Macro-Seedings* hinsichtlich ihrer Größe weiter optimiert. Zahlreiche Kristalle wurden auf ihr Streuvermögen am *inhouse*-Röntgendiffraktometer getestet, jedoch zeigte keiner von ihnen eine Diffraktion mit einer für eine Datensammlung und Strukturaufklärung hinreichenden Auflösung.

Kristallisation der C277S-Mutante der Transglutaminase 2

Es wurde versucht, die C277S-Mutante sowohl in der inaktiven geschlossenen als auch in der aktiven offenen Konformation zu kristallisieren. Zur Kristallisation in der inaktiven Konformation wurde der Proteinlösung GDP hinzugefügt und die Bedingungen des Transglutaminase 2 – Wildtyps verwendet. Um das Protein in die aktive Konformation zu überführen und dort zu stabilisieren, wurde Calciumchlorid zu der Proteinlösung gegeben. Anschließend wurde das Protein unter Verwendung der Kristallisationsbedingungen für die Komplexe des Proteins mit kovalenten Inhibitoren zur Kristallisation angesetzt. Jedoch konnte in keinem der Kristallisationsansätze Kristallwachstum festgestellt werden. In Abhängigkeit von der Präzipitanskonzentration wurde zum Teil die Präzipitation des Proteins beobachtet. Auch mit Hilfe von *Streak-Seeding* mit Kristallen

sowohl des Transglutaminase 2 – Wildtyps als auch der Komplexe mit den Inhibitoren konnte das Kristallwachstum nicht initiiert werden.

Mit Hilfe des Kristallisationsroboters wurde ein *Screening* durchgeführt, mit dem Ziel, neue Kristallisationsbedingungen für die C277S-Mutante sowohl in der inaktiven als auch in der aktiven Konformation zu finden. Das *Screening* wurde daher in Anwesenheit und in Abwesenheit von Calciumchlorid durchgeführt. Es wurden jeweils die *Screening*-Lösungen Classics, Cryos, JCSG+, PACT und Anions verwendet. In zwei Tropfen, die die mit Calciumchlorid versetzte Proteinlösung enthielten, konnten form-schöne Kristalle beobachtet werden. Diese wurden jedoch nach Testen am *inhouse*-Röntgendiffraktometer anhand ihres Diffraktionsmusters als Salzkristalle identifiziert. In den beschriebenen Fällen enthielten die Reservoirlösungen Phosphatsalze, so dass vermutlich Calciumphosphatkristalle entstanden. Ein weiteres Kristallwachstum konnte nicht beobachtet werden.

Kristallisation von Komplexen der Transglutaminase 2 mit kovalent gebundenen Inhibitoren

In der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 in der inaktiven Konformation ist das aktive Zentrum durch eine Schleife der β -*Barrel* Domäne 1 blockiert. Die Transglutaminase 2 in Komplex mit einem Inhibitor zu kristallisieren, setzt daher eine Konformationsänderung des Proteins voraus. Jark Böttcher hatte bereits versucht, die Proteinlösung des Transglutaminase 2 – Wildtyps mit verschiedenen Inhibitoren der ZEDIRA GmbH zu versetzen und die jeweiligen Komplexe zu kristallisieren. Jedoch konnte in den Ansätzen kein Kristallwachstum beobachtet werden. Daraufhin wurde die Transglutaminase 2 bereits bei der ZEDIRA GmbH mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert und der Komplex anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt, wobei der überschüssige Inhibitor abgetrennt wurde. Nach der Vorabpublikation der Kristallisationsbedingungen eines kovalenten Komplexes der Transglutaminase 2 (PDB-Code 2Q3Z) in der Proteindatenbank wurde ein Komplex aus in Insektenzellen produzierter Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 28 in einer Konzentration von 7 mg/ml hergestellt. Dieser wurde unter Verwendung der beschriebenen Bedingungen zur Kristallisation angesetzt. Es konnte jedoch kein Kristallwachstum festgestellt werden.

Die Veröffentlichung der ersten Kristallstruktur der Transglutaminase 2 im Komplex mit einem kovalenten Inhibitor in der aktiven Konformation [6] lieferte schließlich weitere Details zur Herstellung der Komplexe, die von der ZEDIRA GmbH so hinreichend

wie möglich adaptiert wurden. Zum Beispiel wurde die Transglutaminase 2 von nun an in *E. coli* – Zellen exprimiert. Die frisch hergestellte Transglutaminase 2 wurde dann mit dem jeweiligen Inhibitor im Verhältnis 1:50 zur Inkubation angesetzt, erst für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Es wurden nun Komplexe mit verschiedenen Inhibitoren hergestellt und zur Kristallisation angesetzt. Der Komplex der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 28 wurde massenspektrometrisch untersucht, um die kovalente Bindung des Inhibitors an das katalytisch aktive Cystein 277 zu überprüfen. Diese konnte bestätigt werden.

Die Komplexe der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 kristallisierten innerhalb weniger Tage zu rautenförmigen Kristallen, wie die Abbildungen beispielhaft zeigen.

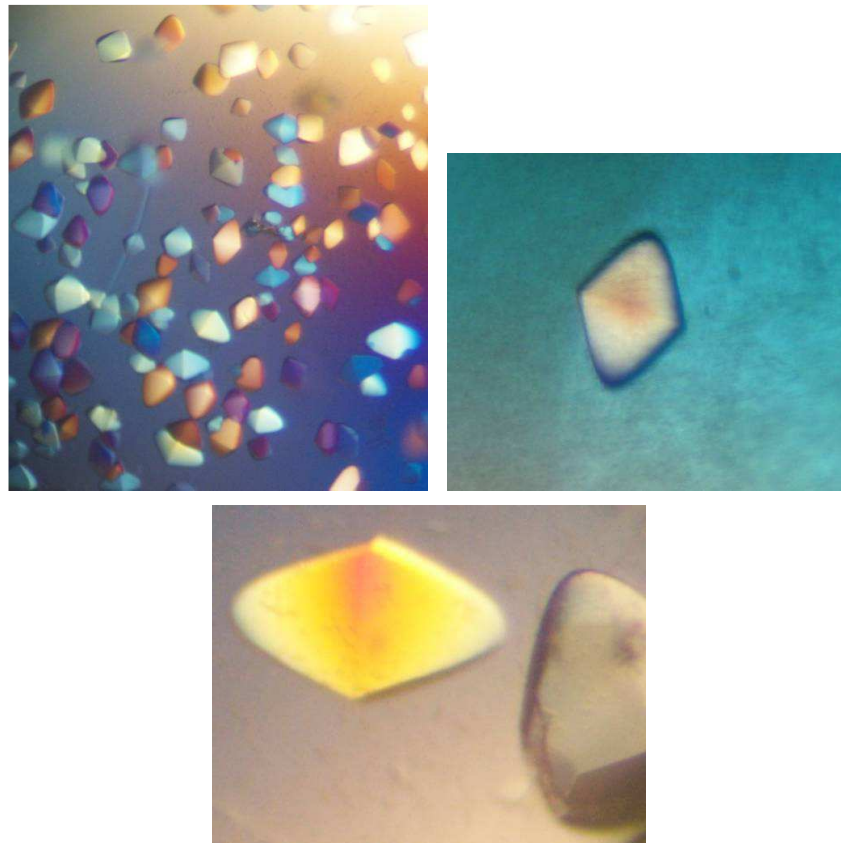


Abbildung 75: Fotos von Kristallen der Komplexe der Transglutaminase 2 mit kovalent gebundenen Inhibitoren

Die Kristallisation zeigte sich als stark abhängig von der Präzipitanskonzentration. Bei niedrigeren Ammoniumsulfatkonzentrationen blieben die Tropfen in den Kristallisationsansätzen klar. Mit zunehmender Ammoniumsulfatkonzentration kam es zur Kristallisation von vielen kleinen Kristallen und schließlich zur Entstehung von braunem Prä-

zipitat. Nach einigen Tagen wuchsen in den Tropfen mit dem Präzipitat jedoch noch Kristalle heran, die in der Regel zu den größten der erhaltenen Kristalle zählten. Für die Datensammlung wurden dann auch die jeweils größten Kristalle ausgewählt, da sich herausgestellt hatte, dass ihr Streuvermögen am besten war. Es erwies sich dabei als schwierig, die Kristalle aus dem Präzipitat herauszulösen, da sich häufig ein hautartiger Überzug über den Kristallen gebildet hatte. Der pH-Wert des HEPES-Puffers wurde zwischen pH 6,75 und pH 7,5 variiert. Jedoch konnte kein signifikanter Einfluss des pH-Werts im verwendeten pH-Bereich auf die Kristallisation festgestellt werden.

Die Komplexe der Transglutaminase 2 mit weiteren Inhibitoren kristallisierten nicht unter Verwendung der beschriebenen Bedingungen. Es kam zwar in Abhängigkeit von der Präzipitankonzentration zu einer Präzipitation des Proteins, aber es konnte kein Kristallwachstum beobachtet werden. Mit Hilfe von *Streak-Seeding* wurde versucht, die Kristallisation dieser Komplexe zu initiieren, dies blieb jedoch erfolglos. Weiterhin wurden kleine Kristalle des Komplexes der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 28 in die Tropfen der Kristallisationsansätze der anderen Komplexe überführt, mit dem Ziel, diese dort weiter wachsen zu lassen. Dies sollte ermöglichen, die Struktur eines gemischten Komplexes der Transglutaminase 2 mit zwei verschiedenen Inhibitoren zu bestimmen, um Aufschluss über den Bindungsmodus des Inhibitors zu bekommen, der bisher nicht im Komplex mit der Transglutaminase 2 kristallisiert war. Jedoch wuchsen die transferierten Kristalle in den die anderen Komplexe beinhaltenden Tropfen nicht weiter heran. Auch eine Mischung zweier Lösungen mit verschiedenen Komplexen, einer kristallisierbar, einer nicht, im Verhältnis 1:1, führte nicht zu einer erfolgreichen Kristallisation. Tabelle 19 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Komplexe der Transglutaminase 2 und ihr Verhalten in Bezug auf die Kristallisation.

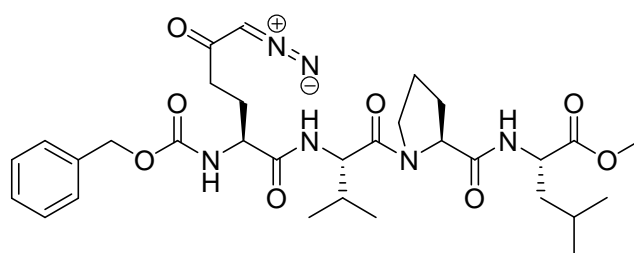
Die Komplexe mit den Inhibitoren ZED 1098 und ZED 1227 wurden direkt nach Abschluss des Herstellungsverfahrens von der ZEDIRA GmbH gekühlt geliefert, damit das Proteinmaterial nicht eingefroren werden musste. Somit sollte ein negativer Einfluss des Einfrierens auf die Qualität des Proteinmaterials ausgeschlossen werden. Jedoch resultierte dies wiederum nicht in der Kristallisation eines der Komplexe. Die Komplexe, die erfolgreich kristallisiert werden konnten, wurden dagegen allesamt gefroren geliefert und erst vor Beginn der Kristallisationsansätze aufgetaut.

Bezeichnung des Inhibitors	Konzentration der eingesetzten Lösung des Komplexes	Kristallisation	Aufklärung der Kristallstruktur	Screening nach neuen Kristallisationsbedingungen
ZED 4	10,0 mg/ml	+	+	-
ZED 27	10,0 mg/ml	+	+	-
ZED 28	7,9 mg/ml 10,0 mg/ml	+	+	+
ZED 77	10,0 mg/ml	-	-	-
ZED 80	10,0 mg/ml	-	-	-
ZED 987	3,4 mg/ml 8,0 mg/ml	-	-	-
ZED 1035	7,4 mg/ml 9,2 mg/ml	-	-	+
ZED 1098	7,8 mg/ml 10,0 mg/ml	-	-	-
ZED 1227	8,5 mg/ml	-	-	-
ZED 1301	10,0 mg/ml	-	-	-

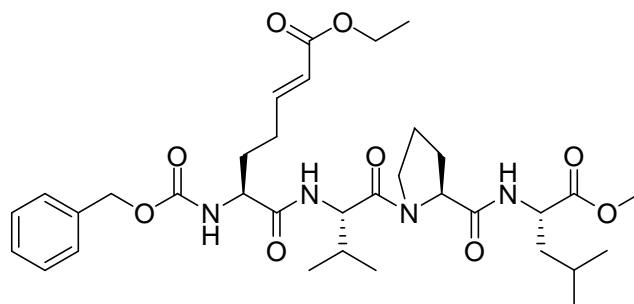
Tabelle 19: Übersicht über die zur Kristallisation eingesetzten Komplexe der Transglutaminase 2 mit kovalent gebundenen Inhibitoren

Mit den Komplexen der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 28 und ZED 1035 wurde ein *Screening* am Kristallisationsroboter durchgeführt, mit dem Ziel, neue Kristallisationsbedingungen zu finden. ZED 28 wurde in einer Konzentration von 7,9 mg/ml und ZED 1035 in zwei verschiedenen Konzentrationen, 7,4 mg/ml und 9,2 mg/ml eingesetzt. Jedoch konnten in keinem Fall neue Kristallisationsbedingungen gefunden werden.

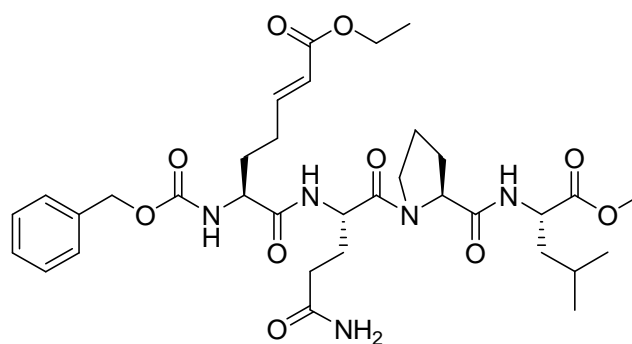
Die nachfolgenden Abbildungen zeigen einen Teil der Strukturformeln der Inhibitoren, die im Komplex mit der Transglutaminase 2 zur Kristallisation angesetzt wurden. Die hier aus Gründen der Geheimhaltung nicht abgebildeten Inhibitoren sind gegenüber den gezeigten Verbindungen in ihrem peptidomimetischen Charakter reduziert.



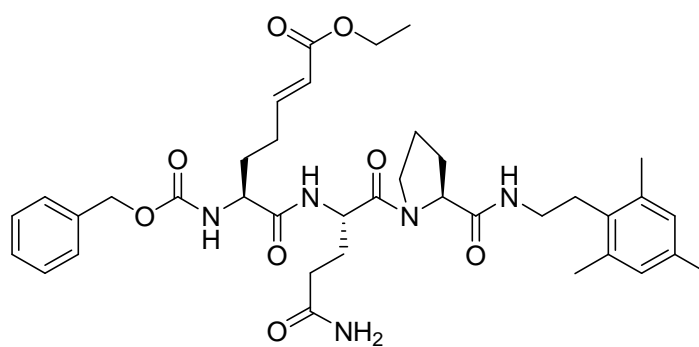
ZED 4



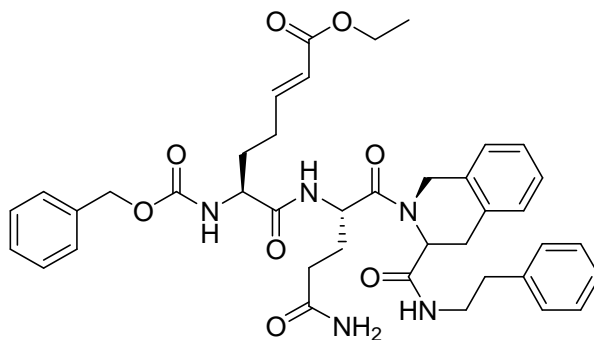
ZED 27



ZED 28



ZED 77



ZED 80

Abbildung 76: Strukturformeln einiger Inhibitoren, die im Komplex mit der Transglutaminase 2 zur Kristallisation angesetzt wurden

Datensammlung und Strukturverfeinerung

Mit Hilfe von Synchrotronstrahlung konnten an der Beamline 14.2 des Synchrotrons BESSY II Datensätze von Komplexen der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 gesammelt werden. Die Auflösung der Datensätze liegt zwischen 2.25Å und 2.50Å. Tabelle 20 zeigt die Parameter, die die Daten und die Auswertung beschreiben. Jedem Datensatz konnte die tetragonale Raumgruppe $P4_12_12$ zugeordnet werden.

Während der Datensammlung konnte beobachtet werden, dass die Reflexe häufig nicht hinreichend separiert vorlagen. Dies war insbesondere bedingt durch die Länge einer der Zellkonstanten in den Kristallen, die bei den drei Kristallstrukturen zwischen 310.3Å und 316.5Å liegt. Um die Reflexe so separiert wie möglich zu detektieren, wurde die Distanz zum Detektor möglichst groß gewählt, wobei jedoch auch die Auflösung der Kristallstruktur berücksichtigt werden musste. Im Fall des Komplexes mit dem Inhibitor ZED 28 wurde der Detektor außerdem um einen Winkel von 5° (2 theta) nach oben gefahren. Der Winkel phi, um den der Kristall während der Aufnahme eines Diffraktionsbildes gedreht wird, wurde außerdem möglichst klein gewählt. Tabelle 21 zeigt die für die Datensammlung der jeweiligen Komplexe verwendeten Parameter.

Die Koordinaten der drei Strukturen wurden in der Proteindatenbank unter den Codes 3S3J, 3S3S und 3S3P hinterlegt werden.

Bezeichnung der Struktur	TG2 – ZED 4	TG2 – ZED 27	TG2 – ZED 28
Datensammlung und Prozessierung			
Wellenlänge [Å]	0.91841	0.91841	0.91841
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszellparameter [Å;°]	a, b = 72.5, c = 316.5; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$	a, b = 71.4, c = 310.3; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$	a, b = 71.0, c = 310.4; $\alpha, \beta, \gamma = 90.0$
Auflösungsbereich [Å]	25.00 – 2.25 (2.30 – 2.25)	50.00 – 2.30 (2.35 – 2.30)	50.00 – 2.50 (2.56 – 2.50)
Anzahl einzigartiger Reflexe	38467 (2464)	34641 (2006)	25858 (1339)
R _{sym} [%]	9.7 (39.2)	7.5 (34.5)	6.9 (14.7)
Vollständigkeit [%]	92.7 (92.2)	93.5 (84.3)	89.4 (71.5)
Redundanz	4.7 (2.7)	7.0 (4.8)	4.7 (3.8)
I / σ	12.1 (2.4)	23.5 (3.5)	17.2 (6.6)
Matthews-Koeffizient [Å ³ /Da]	2.7	2.6	2.5
Lösungsmittelgehalt [%]	54.3	51.9	51.4
Strukturverfeinerung			
Auflösungsbereich [Å]	24.90 – 2.25	49.87 – 2.30	46.7 – 2.50
Anzahl der Reflexe für die Verfeinerung	36528	32873	24522
Anzahl der Reflexe im Testdatensatz	1931	1732	1242
R-Faktor [%]	21.4	22.7	22.6
Freier R-Faktor [%]	28.1	29.7	28.6
RMSD-Werte			
Bindungslängen [Å]	0.008	0.008	0.007
Bindungswinkel [°]	1.084	1.054	1.071

Durchschnittliche B-Werte			
Protein	54.0	47.9	60.6
Inhibitor	55.2	51.8	70.9
Wasser	44.3	41.2	49.1
Weitere Liganden	61.8	56.6	68.1
Ramachandran Plot			
Aminosäuren in bevorzugten Regionen [%]	86.5	89.1	88.8
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen [%]	13.0	10.1	11.0
Aminosäuren in allgemein erlaubten Regionen [%]	0.4	0.6	0.2
Aminosäuren in nicht erlaubten Regionen [%]	0.2	0.2	-
Sonstiges			
Anzahl der Aminosäuren	650	620	611
Anzahl der Atome des Inhibitors	42	46	48
Anzahl der Wassermoleküle	125	153	50
Anzahl der Atome weiterer Liganden	36	30	30
PDB-Code	3S3J	3S3S	3S3P

Tabelle 20: Kristallographische Tabelle zu den Strukturen der Komplexe der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28

Bezeichnung des Komplexes	Distanz zum Detektor	$\Delta \phi$	2 theta
TG2 – ZED 4	280 mm	0.20°	-
TG2 – ZED 27	250 mm	0.25°	-
TG2 – ZED 28	375 mm	0.25°	5°

Tabelle 21: Besonderheiten in der Einstellung der Parameter für die Datensammlung aufgrund der langen Zellachse der Komplexe

Die Differenzelektronendichte in der Bindetasche definiert in Anbetracht der relativ niedrigen Auflösung der drei Kristallstrukturen jeweils gut die Struktur und Anordnung der Liganden in der Bindetasche, wie die Abbildungen 77, 78 und 79 zeigen.

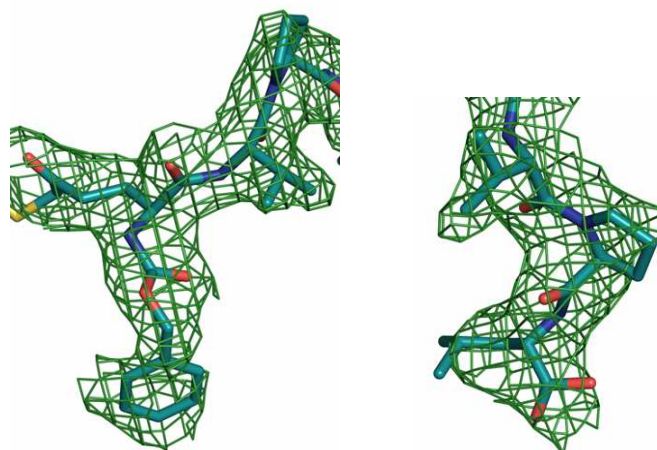


Abb. 77: $F_o - F_c$ -Elektronendichtekarten für den Inhibitor ZED 4 (σ -Level 1.50)

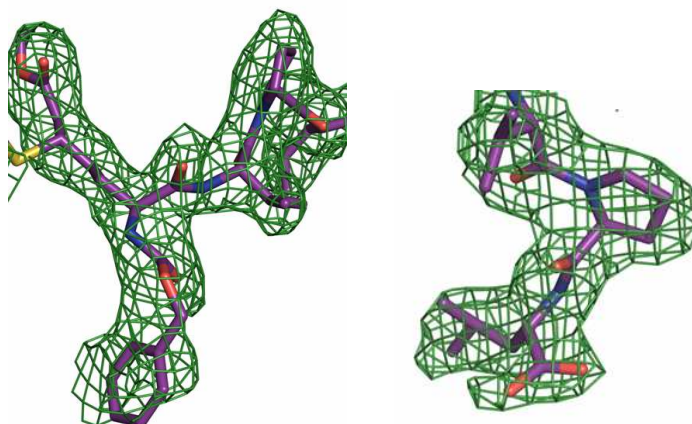


Abb. 78: $F_o - F_c$ -Elektronendichtekarten für den Inhibitor ZED 27 (σ -Level 1.50)

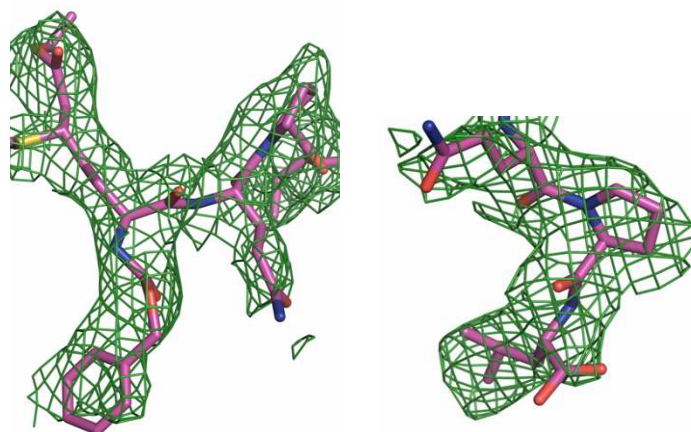


Abb. 79: F_0 - F_c -Elektronendichtekarten für den Inhibitor ZED 28 (σ -Level 1.50)

Lediglich die Position der Methylgruppe der Esterfunktion am C-Terminus der Inhibitoren wird jeweils nicht durch die Elektronendichtekarte definiert und wurde daher aus den Koordinaten der Inhibitoren entfernt.

Die Auflösung der Kristallstrukturen der Komplexe der Transglutaminase 2 ist im Vergleich zu den weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Kristallstrukturen verhältnismäßig niedrig. Die Abbildungen 80 und 81 zeigen beispielhaft die $2F_0$ - F_c -Elektronendichtekarte eines Heptapeptids aus der Kristallstruktur des Komplexes der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 27 mit einer Auflösung von 2.30\AA im Vergleich zu der eines Heptapeptidausschnitts aus der Kristallstruktur der HIV-1 Protease im Komplex mit dem Inhibitor NK 101 bei einer Auflösung von 1.38\AA (PDB-Code 3QN8). Diese Abbildung soll verdeutlichen, welchen Einfluss die Auflösung der experimentellen Daten auf die Qualität der Elektronendichte und damit auf die Richtigkeit der Koordinaten als deren Interpretation und auch auf die Arbeit des Kristallographen hat. Mit zunehmender Auflösung wird die Elektronendichte besser definiert und klarer und zeigt separate Maxima, die der Position individueller Atome zugeordnet werden können. [4]

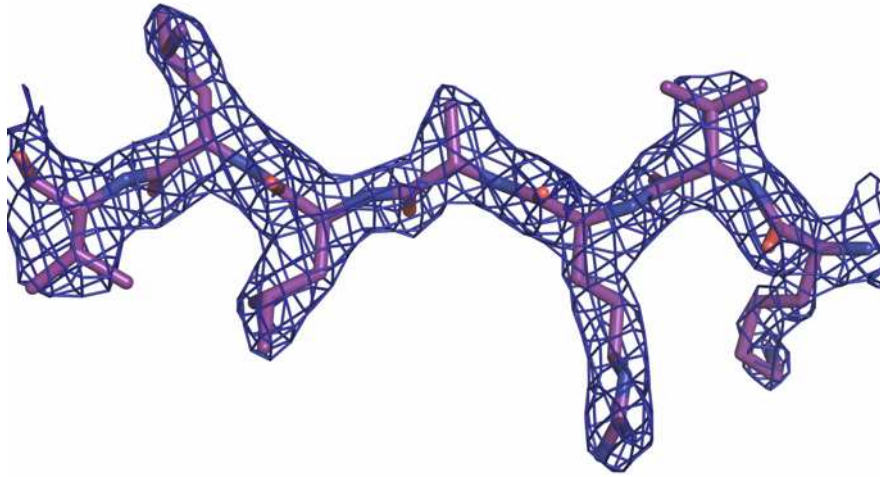


Abbildung 80: $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte für ein Heptapeptid aus der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 27 bei einer Auflösung von 2.30\AA (σ -Level 1.50)

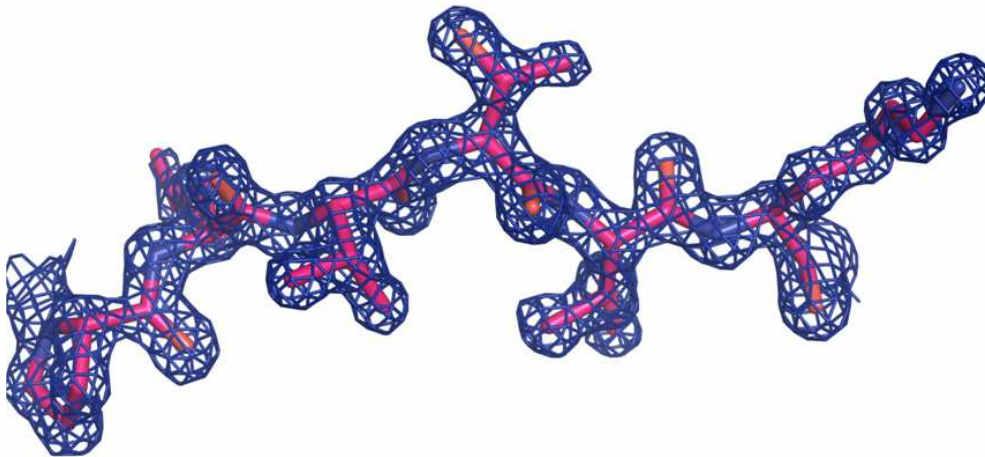


Abbildung 81: $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte für ein Heptapeptid aus der Kristallstruktur der HIV-1 Protease mit dem Inhibitor NK 101 bei einer Auflösung von 1.39\AA (σ -Level 2.0)

Während der Verfeinerung der Kristallstrukturen wurde deutlich, dass einige Teile der Proteinkette nicht durch die Elektronendichte definiert wurden. Hierbei handelt es sich um flexible Bereiche innerhalb der Struktur, wie zum Beispiel die Verbindungen zwischen den einzelnen Domänen des Proteins, aber auch an der Oberfläche des Proteins liegende Schleifen-Bereiche. Ist die Elektronendichte eines solch ungeordneten Bereichs im Protein über multiple, periodisch nicht geordnete Konformationen verteilt, kann es passieren, dass wegen fehlender Periodizität verschwindet und für den Kristallographen nicht sichtbar und interpretierbar ist. [4]

Tabelle 22 zeigt, welche Bereiche der Proteinkette durch die Elektronendichtekarte definiert werden und listet die Anzahl der Kettenbrüche und der fehlenden Aminosäuren auf. Die Transglutaminase 2 besteht aus 687 Aminosäuren, am N-Terminus befindet sich zusätzlich die Aminosäure Methionin und ein sogenannter His-Tag aus 6 Histidinen. Die nicht durch die Elektronendichtekarte definierten Aminosäuren am N- und am C-Terminus gehen in der Tabelle in die Anzahl fehlender Aminosäuren mit ein, jedoch wird dies nicht als Kettenbruch betrachtet.

Bezeichnung des Komplexes	Aminosäuren, die durch die Elektronendichtekarte definiert werden	Anzahl der Kettenbrüche	Anzahl der Aminosäuren, die nicht durch die Elektronendichtekarte definiert werden
ZED 4	2 – 305 310 – 318 328 – 361 367 – 406 414 – 461 471 – 685	5	44
ZED 27	1 – 231 233 – 239 253 – 266 277 – 305 309 – 317 328 – 361 370 – 406 414 – 461 472 – 683	8	73
ZED 28	2 – 239 253 – 266 277 – 304 309 – 317 328 – 406 414 – 461 472 – 594 604 – 683	7	75

Tabelle 22: Darstellung von nicht durch die Elektronendichtekarte definierten Bereichen in den Kristallstrukturen der Komplexe der Transglutaminase 2 mit kovalent bindenden Inhibitoren

Abbildung 82 zeigt beispielhaft einige Bereiche der katalytischen Domäne der Kristallstruktur des Komplexes der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 27, in denen der Verlauf der Hauptkette nicht durch die Elektronendichtekarte definiert wird.

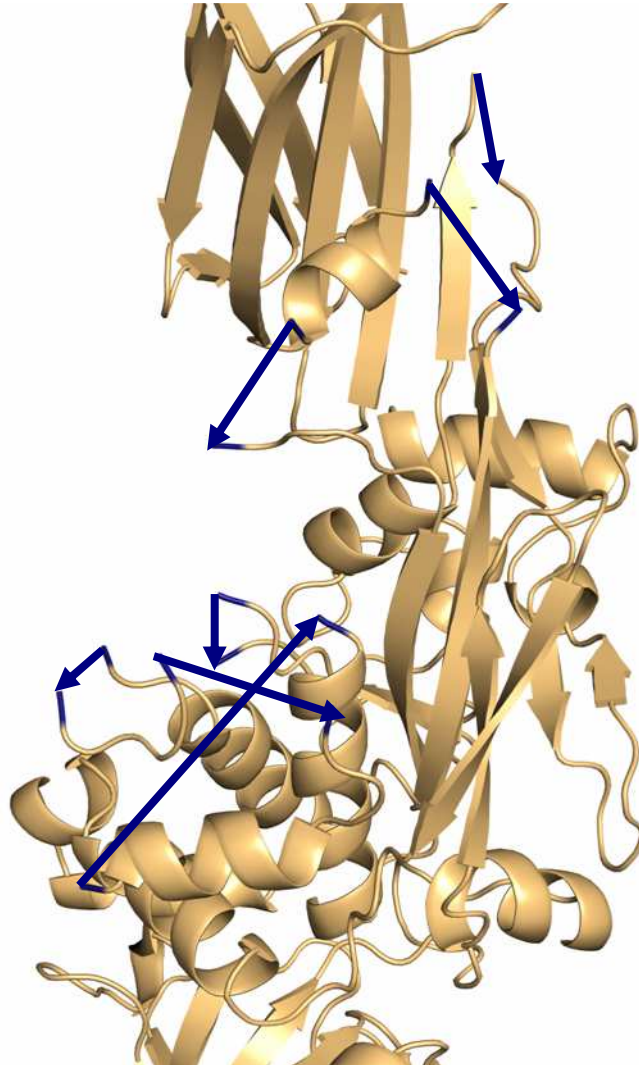


Abbildung 82: Einige Bereiche der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 27, die nicht durch die Elektronendichtekarte definiert werden (dargestellt durch Pfeile)

Im Vergleich zu der Kristallstruktur des Komplexes mit dem Inhibitor ZED 4 weisen die Kristallstrukturen der Komplexe mit den Inhibitoren ZED 27 und ZED 28 zwei zusätzliche Kettenbrüche auf. Die Kopfgruppe der Inhibitoren ZED 27 und ZED 28, der beschriebene Michael-Akzeptor, hat einen größeren Raumbedarf im Vergleich zu dem Inhibitor ZED 4, der über ein Diazoketon an das katalytisch aktive Cystein 277 bindet. Dadurch wurden Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur des Proteins herbeigeführt, die letztendlich dazu führten, dass weitere Bereiche der Hauptkette nicht durch

die Elektronendichtekarte definiert werden. Auf die Unterschiede im Bindungsmodus der jeweiligen Inhibitoren und deren Einfluss auf die Struktur des Proteins wird nachfolgend detaillierter eingegangen.

Bei der Verfeinerung der Kristallstrukturen mit dem Programm PHENIX [65] werden zusätzlich der R-Faktor und der freie R-Faktor ohne Berücksichtigung der anisotropen Skalierung der Daten und der Bulk-Solvent-Korrektur berechnet. Dabei fiel auf, dass diese R-Faktoren jeweils signifikant höher waren, so dass überprüft werden musste, ob die verwendeten Daten eine Anisotropie aufwiesen. Tabelle 23 zeigt die R-Faktoren mit und ohne Berücksichtigung der anisotropen Skalierung und der Bulk-Solvent-Korrektur.

Bezeichnung des Komplexes	R-Faktoren mit anisotroper Skalierung und Bulk-Solvent-Korrektur		R-Faktoren ohne anisotrope Skalierung und Bulk-Solvent-Korrektur	
	R-Faktor [%]	Freier R-Faktor [%]	R-Faktor [%]	Freier R-Faktor [%]
TG2 – ZED 4	21.5	28.1	33.8	35.0
TG2 – ZED 27	22.7	29.7	37.5	55.7
TG2 – ZED 28	22.6	28.6	42.5	44.3

Tabelle 23: R-Faktoren der Kristallstrukturen der Komplexe der Transglutaminase 2 mit kovalent gebundenen Inhibitoren mit und ohne Berücksichtigung der anisotropen Skalierung und Bulk-Solvent-Korrektur

Die anisotrope Skalierung gleicht während der Strukturverfeinerung die durch die Anisotropie der Daten hervorgerufenen Effekte aus. [135] Eine Anisotropie, die Richtungsabhängigkeit der Diffraktionsqualität, entsteht, wenn das Beugungsbild eines Kristalles in einer Richtung eine höhere Auflösung erreicht als in einer anderen Richtung. Eine Ursache dafür kann sein, dass die Anzahl der Kontakte im Kristallgitter in der einen Richtung entsprechend höher ist als in der anderen. [136] Beim Prozessieren der Daten werden die Reflexe jedoch in kreisförmigen Auflösungsschalen zusammengefasst. Somit kann es passieren, dass in Datensätzen mit einer stark anisotropen Datenverteilung zahlreiche schwache Reflexe mit erfasst werden und so die Qualität der Daten und letztendlich den R-Faktor negativ beeinflusst wird. Mit Hilfe des Diffraction Anisotropy Servers [137] wurden die Daten der drei Kristallstrukturen auf das Ausmaß der Anisotropie in ihrem Beugungsverhalten überprüft, in dem die Richtungsabhängigkeit der

Intensitätsabnahme der Reflexe in Abhängigkeit von der Auflösung gemessen wurde. Die Daten der Komplexe der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4 und ZED 27 wiesen eine geringe Anisotropie, die des Komplexes mit dem Inhibitor ZED 28 eine starke Anisotropie des Beugungsbildes auf. Den Analysen des Servers war zu entnehmen, dass die Röntgenstrahlen, die entlang der beschriebenen lange Zellachse im Kristall gestreut wurden, zu einer höheren Auflösung führten als die der insgesamt prozessierten Daten.

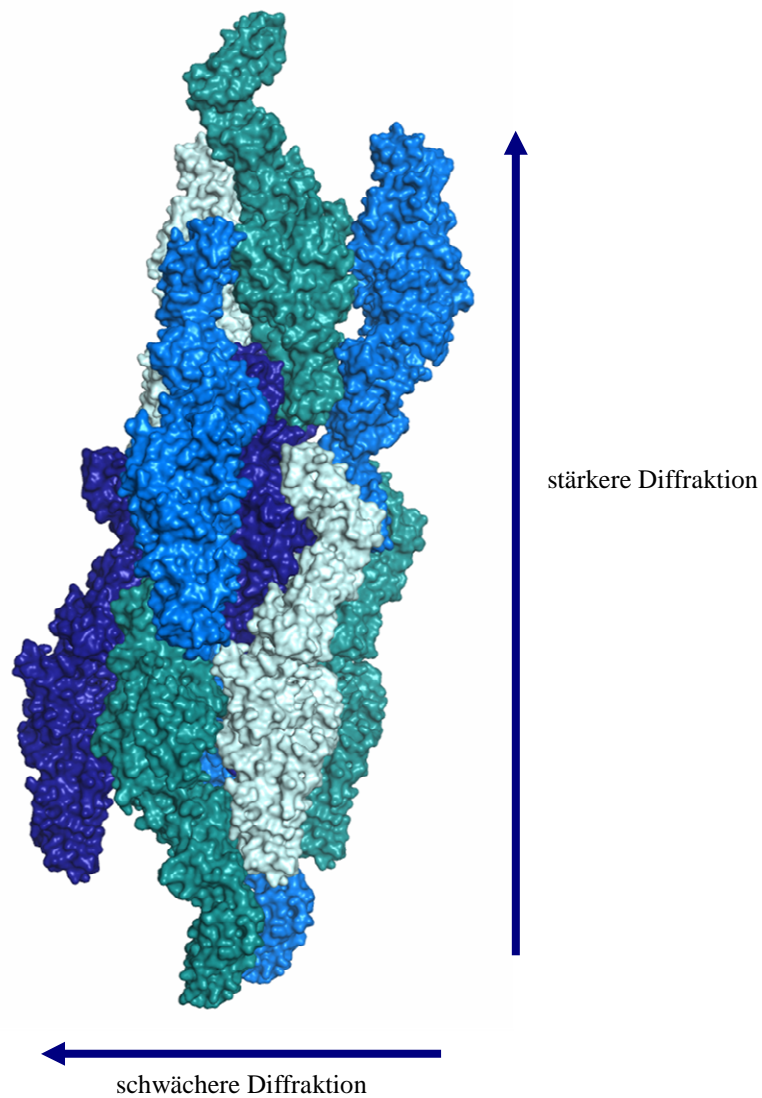


Abbildung 83: Die Anordnung der Moleküle der Transglutaminase 2 im Kristall führt zur Anisotropie der Daten.

Die Oberfläche der verschiedenen Moleküle ist in verschiedenen Blau- und Grüntönen dargestellt.

Somit wurden in diesem Fall nicht zu viele schwache Reflexe erfasst, sondern es sind allenfalls einige starke Reflexe durch das Auflösungslimit nicht detektiert worden.

Theoretisch bestünde die Möglichkeit, die Daten der drei Komplexe bis zu einer höheren Auflösung zu prozessieren und diese mit Hilfe des Diffraction Anisotropy Servers in ellipsoiden Auflösungsschalen zusammenzufassen und anschließend anisotrop zu skalieren. So könnte die Qualität der Datensätze erhöht werden.

Im Bereich der Aminosäuren 231 bis 234 bestehen in allen drei Strukturen Abweichungen der Torsionswinkel zu den erwarteten Ramachandran-Regionen. In der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 4 befindet sich die Aminosäure Asparagin 231, die hier aufgrund mangelnder Elektronendichte der Seitenkette als Alanin behandelt wurde, sogar im nicht erlaubten Bereich des Ramachandran-Plots wie auch die ebenfalls als Alanin erfasste Aminosäure Glutamat 234 in der Struktur des Komplexes mit ZED 27. Mit Hilfe einer Analyse der Sekundärstruktur der Transglutaminase 2 konnte jedoch festgestellt werden, dass die Aminosäuren 230 bis 232 die Spitze eines sogenannten γ -Turns bilden. Abweichungen der Torsionswinkel in diesem Bereich des Proteins wurden bereits in der Literatur beschrieben. [138]

Vergleich der Bindungsmodi der Inhibitoren

Ein Vergleich der Bindungsmodi der drei Inhibitoren zeigt, dass diese in den jeweiligen Strukturen einen sehr ähnlichen Bindungsmodus eingehen. Abbildung 84 zeigt eine Überlagerung der Koordinaten der drei Inhibitoren.

Die Inhibitoren binden über ihre Kopfgruppe kovalent an das katalytische Cystein 277, welches sich in einer Art Tunnel befindet. Die Inhibitoren ZED 27 und ZED 28 besitzen als Kopfgruppe einen Michael-Akzeptor, während der Inhibitor ZED 4 über ein Diazoketon unter Abspaltung von molekularem Stickstoff die kovalente Bindung mit dem katalytischen Cystein 277 eingeht. Die weitere Bindung der Inhibitoren erfolgt an der Oberfläche des Proteins, wobei mehrere Wasserstoffbrückenbindungen gebildet werden und die offene Konformation des Proteins stabilisiert wird.

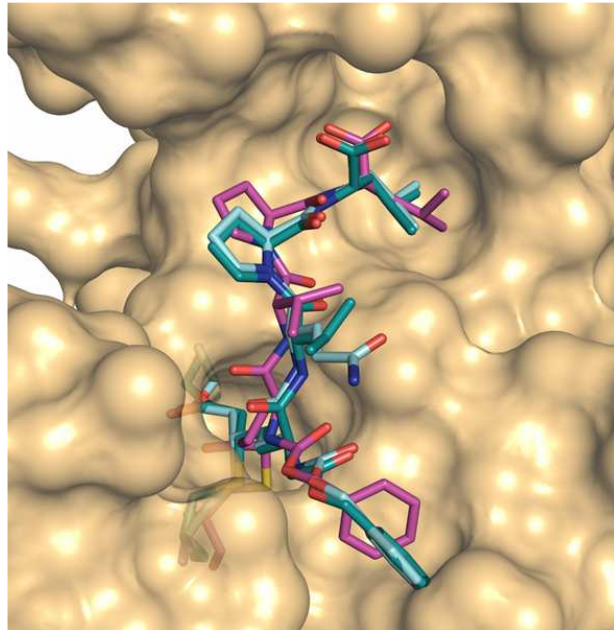


Abbildung 84: Überlagerung der Koordinaten der Inhibitoren ZED 4 (violett), ZED 27 (türkis) und ZED 28 (hellblau)

Abbildung 85 zeigt die kovalente Bindung der Inhibitoren ZED 4 und ZED 27 an die Transglutaminase 2. Die Bindung des Inhibitors ZED 28 erfolgt analog zu der von ZED 27.

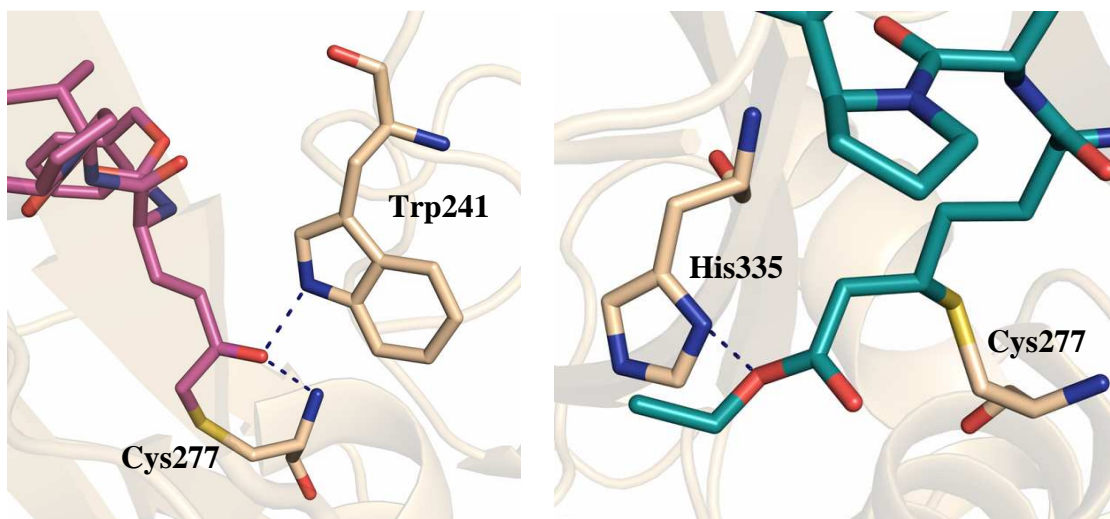


Abbildung 85: Kovalente Bindung der Inhibitoren ZED 4 (links, violett) und ZED 27 (rechts, türkis) an das katalytische Cystein 277 der Transglutaminase 2

Die nach erfolgter kovalenter Bindung und Abspaltung des molekularen Stickstoffs verbliebene Carbonylgruppe des Diazoketons des Inhibitors ZED 4 interagiert mit dem Amidstickstoff des Proteinrückgrats des katalytisch aktiven Cysteins und dem sekundären Stickstoff der Seitenkette der Aminosäure Trp 241. Durch den erhöhten Raumbedarf

der Kopfgruppe der Inhibitoren ZED 27 und ZED 28 wird in diesen Komplexen das Tryptophan aus seiner ursprünglichen Position verdrängt. Seine Position lässt sich in den Kristallstrukturen mit diesen Inhibitoren nicht durch die Elektronendichtekarte definieren. Der Estersauerstoff der Kopfgruppe des Inhibitors ZED 27 geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit His 335 ein. Diese Aminosäure ist Teil der katalytischen Triade der Transglutaminase 2. Diese Interaktion kann durch eine leichte Veränderung in der Konformation des Inhibitors ZED 28 von diesem nicht mehr ausgebildet werden.

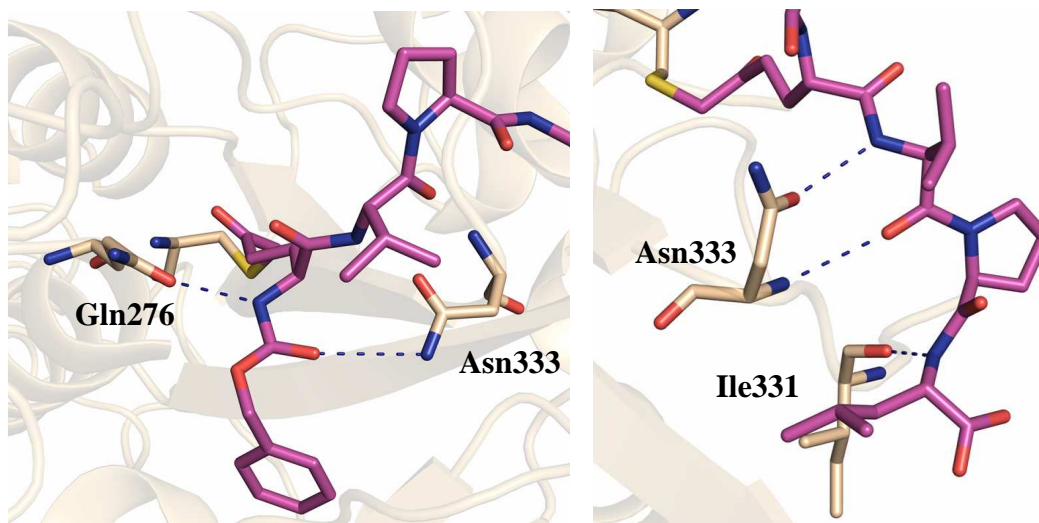


Abbildung 86: Wechselwirkungen des Inhibitors ZED 4 (violett) mit der Transglutaminase 2

Abbildung 86 zeigt beispielhaft die ausgebildeten Wechselwirkungen des Inhibitors ZED 4 mit der Transglutaminase 2. Der N-terminale Amidstickstoff des peptidomimetischen Inhibitors interagiert mit der Seitenkette der Aminosäure Gln 276. Die Position dieser Aminosäure ist wiederum in den Kristallstrukturen der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 27 und ZED 28 aufgrund der bereits beschriebenen Veränderungen in der Struktur des Proteins nicht durch die Elektronendichtekarte definiert. Diese Wechselwirkung kann also in diesen beiden Strukturen allenfalls partiell vorliegen. Die weiteren gezeigten Wasserstoffbrückenbindungen werden von jedem Inhibitor in gleicher Weise eingegangen. Der Carbonylsauerstoff der Schutzgruppe am N-Terminus des Inhibitors interagiert mit dem Amidstickstoff der Seitenkette der Aminosäure Asn 333. Diese geht über den Carbonylsauerstoff der Seitenkette und den Amidstickstoff des Rückgrats weitere Wechselwirkungen zur Hauptkette des Inhibitors ein. Der Benzylring der Schutzgruppe des Inhibitors ZED 4 befindet sich in einer eher hydrophilen Umgebung und wird durch van der Waals-Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Gln 169, Lys 176 und Gly 170 sowie Tyr 516 eines symmetrieäquivalenten Moleküls aus der

Kristallpackung stabilisiert. Im Falle der Inhibitoren ZED 27 und ZED 28 ist der aromatische Ring um etwa 90° gedreht. Die Valin-Seitenkette der Inhibitoren ZED 4 und ZED 27 ist in Richtung des Solvens bzw. des symmetrieäquivalenten Moleküls orientiert und findet dort keinen Partner für hydrophobe Interaktionen. Der Inhibitor ZED 28 besitzt in dieser Position einen Glutamin-Rest und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Amidstickstoff des Rückgrats von Tyr 516 des symmetrieäquivalenten Moleküls aus. Abbildung 87 zeigt diese Wechselwirkung und die Nähe des Symmetrieäquivalents zur Bindestelle der Inhibitoren am Beispiel der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 4.

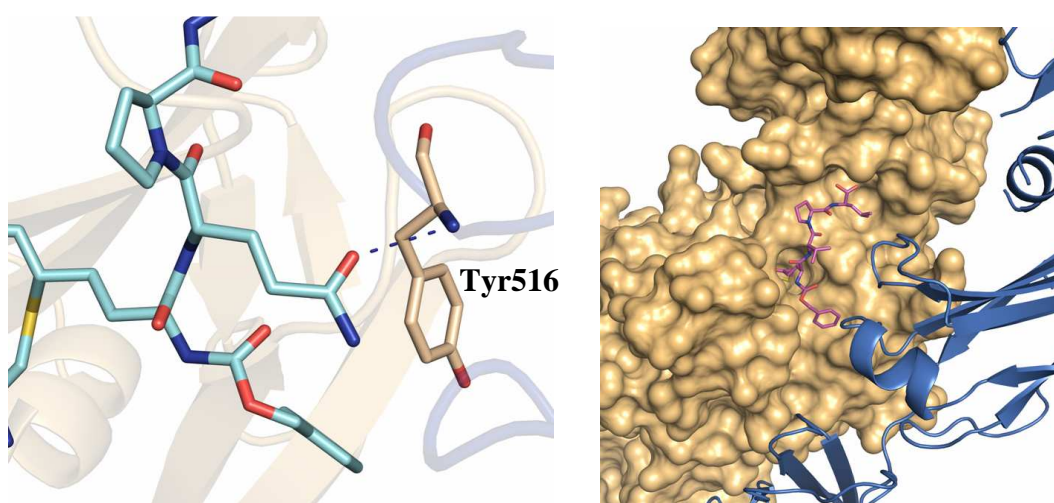


Abbildung 87: Interaktion des Inhibitors ZED 28 (türkis) mit dem symmetrieäquivalenten Molekül (links) und dessen relative Nähe zur Bindestasche am Beispiel der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 mit dem Inhibitor ZED 4 (rechts, violett)

Die Prolin-Seitenkette der Inhibitoren geht von der Waals-Wechselwirkungen mit der Aminosäure Trp 332 ein und orientiert den verbleibenden Teil des Inhibitors in Richtung einer hydrophoben Tasche. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird vom Carbonylsauerstoff des Rückgrats der Aminosäure Ile 331 zum Inhibitorrückgrat ausgebildet. Die Leucin-Seitenkette am C-Terminus der Inhibitoren zeigt in Richtung der beschriebenen hydrophoben Tasche. Im Falle der Inhibitoren ZED 27 und ZED 28 werden von der Waals-Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Ile 331, Trp 332, Asn 333 und Leu 420 ausgebildet. Der Inhibitor ZED 4 ragt etwas tiefer in die hydrophobe Tasche hinein und interagiert hier mit den Aminosäuren Asn 302, Ser 303, Ala 304, Trp 332 und Asn 333. Die Position der Methylgruppe der Esterfunktion am C-Terminus der Inhibitoren kann jeweils nicht aus der unzureichend definierten Elektronendichtekarte entnommen werden, so dass für diese Gruppe keine Koordinaten angegeben wer-

den können. Die Methylgruppe wird daher auch in den Abbildungen nicht gezeigt. Der Ester geht keinerlei Wechselwirkungen mit dem Protein ein.

Einfluss des Michael-Akzeptors als Kopfgruppe auf die Struktur der Transglutaminase 2

In den Kristallstrukturen der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 27 und ZED 28 sind einige Bereiche des Proteins nicht in der Elektronendichtekarte definiert. In der Struktur mit dem Inhibitor ZED 4 und auch in der bereits publizierte Struktur eines Komplexes der Transglutaminase 2 [6] sind sie allerdings gut erkennbar. Abbildung 88 zeigt die Verschiebung der Position der Aminosäure Cystein 277 durch den erhöhten Raumbedarf der Kopfgruppe der Inhibitoren ZED 27 und ZED 28 und den großen Bereich des Proteins, der als Folge seine Position verändert und nicht mehr durch die Elektronendichtekarte definiert wird.

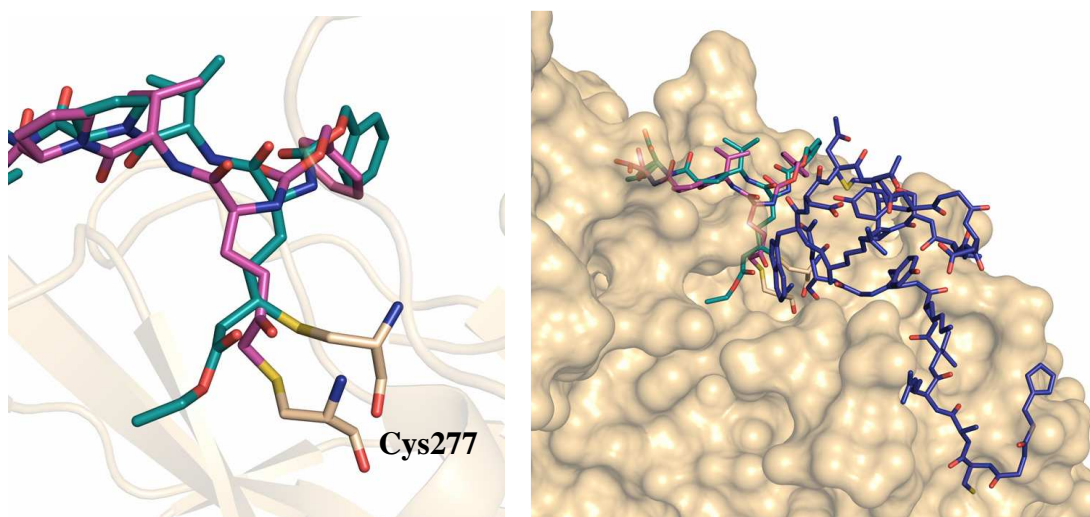


Abbildung 88: Position der Aminosäure Cystein 277 in den Kristallstrukturen der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4 (türkis) und ZED 27 (violett) (links) und den als Folge der Verschiebung nicht mehr durch die Elektronendichtekarte definierten Bereich des Proteins (blau, Aminosäuren 240-252 sowie 267-276) (rechts)

Konformation des Dipeptids Cys 370 – Cys 371

In der als initiales Modell für den Molekularen Ersatz verwendeten Kristallstruktur eines Komplexes der Transglutaminase 2 [6] besteht zwischen den Aminosäuren Cys 370 und Cys 371 eine kovalente Verknüpfung, eine sogenannte Disulfidbrücke, bei der die Peptidbindung des Dipeptids eine *cis*-Konfiguration einnehmen muss. Bei der Verfeinerung der Kristallstrukturen der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 zeigte die Elektronendichtekarte jedoch eindeutig, dass die beiden Cystein-

Aminosäuren in diesen Strukturen keine Disulfidverbindung eingehen, sondern reduziert vorliegen. Den Unterschied in den Konformationen in den Kristallstrukturen zeigt Abbildung 89.

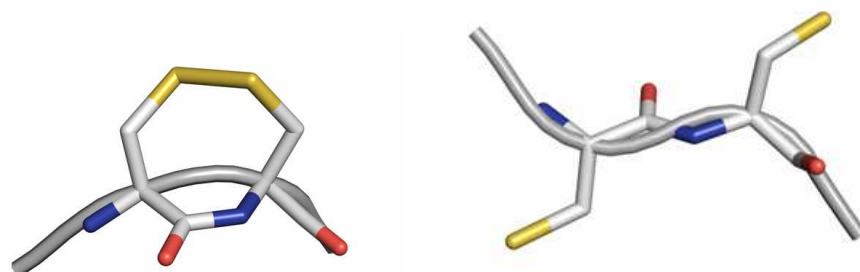


Abbildung 89: Konformation des Dipeptids Cys 370 - Cys 371 als Disulfidbrücke in der oxidierten Form in der Kristallstruktur 2Q3Z [6] (links) und in den Kristallstrukturen der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 in der reduzierten Form (rechts)

Zusammenfassung und Diskussion

Drei Komplexe der Transglutaminase 2 mit verschiedenen kovalent bindenden Inhibitoren konnten erfolgreich in der offenen Konformation des Proteins kristallisiert werden. Die Strukturaufklärung vermittelt wertvolle Informationen über die strukturellen Eigenschaften dieses interessanten Proteins und den Bindungsmodus der Inhibitoren.

Es gelang weiterhin, die Transglutaminase 2 in Anwesenheit von GDP, also vermutlich in der geschlossenen Konformation, zu kristallisieren. Hier war jedoch keine Strukturaufklärung möglich, da die erhaltenen Kristalle keine hinreichendes Diffraktionsvermögen zeigten. Eine weitere Optimierung des Kristallwachstums, zum Beispiel durch den Zusatz von verschiedenen Additiven zu den Kristallisationsbedingungen, wäre dafür erforderlich gewesen. Da jedoch die Kristallstruktur des Proteins in der geschlossenen, nicht aktiven Konformation bereits bekannt ist und eine Reproduktion der Strukturaufklärung voraussichtlich keine neuen Einsichten erwarten ließ, wurde das Projekt nach Abwägung des Zeitaufwands gegen den potentiellen Nutzen nicht weiter verfolgt. Mittlerweile wurde auch die Struktur der Transglutaminase 2 im Komplex mit ATP publiziert. [115]

Von weitaus größerem Interesse für das Wirkstoffdesign sind die Kristallstrukturen des Proteins in der offenen Konformation, da im Verlauf der Aktivierung nicht nur eine Verschiebung der Domänen, sondern auch strukturelle Änderungen im Bereich der katalytischen Domäne und der Bindetasche eintreten. Die Kristallisation der C277S-

Mutante der Transglutaminase 2, deren Mutation des katalytisch aktiven Cysteins 277 die Vernetzung der Moleküle untereinander in der Lösung verhindern sollte, gelang jedoch nicht. Weder die bereits etablierten Kristallisationsbedingungen noch ein *Screening* führten zu einer erfolgreichen Kristallisation des Proteins.

Diese gelang schließlich durch die Bildung kovalenter Komplexe mit peptidomimetischen Inhibitoren, die von den natürlichen Substraten des Enzyms abgeleitet wurden. Dabei half die Publikation der Bedingungen sowohl für die Kristallisation als auch für die Herstellung der Komplexe des Proteins mit den Inhibitoren. Ein umfangreiches *Screening* mit Hilfe des Kristallisationsroboters führte auch hier nicht zum Erfolg: Die Kristallisation der Komplexe ließ sich nur unter Verwendung der beschriebenen Kristallisationsbedingungen zu einem Erfolg bringen. Weiterhin war eine erfolgreiche Kristallisation abhängig von der Auswahl des Inhibitors. Die Komplexe mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 kristallisierten spontan und reproduzierbar, während die Kristallisationsansätze mit sieben weiteren Inhibitoren nicht zum Erfolg führten.

Es stellt sich die Frage, worin der Einfluss des Inhibitors auf die Kristallisierbarkeit der Komplexe besteht. Die Affinität der verwendeten Inhibitoren zum Protein ist vergleichbar und spielt bei einer irreversiblen kovalenten Bindung eine untergeordnete Rolle. Die Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf. Die Kristallisation der Komplexe der Transglutaminase 2 mit zwei weiteren peptidomimetischen Inhibitoren, ZED 77 und ZED 80, gelang nicht. Diese unterscheiden sich strukturell ebenfalls nur geringfügig von den drei anderen Inhibitoren. Beide besitzen am C-Terminus einen aromatischen Substituenten, der dazu vorgesehen war, die beschriebene hydrophobe Tasche zu besetzen. Die Aminosäure Prolin ist bei der Verbindung ZED 80 durch einen Tetrahydroisoquinolinring ersetzt. Solch scheinbar kleine Veränderungen in der Struktur der Inhibitoren sind hier offenbar bereits entscheidend für den Erfolg oder Misserfolg der Kristallisation. Die Inhibitoren ZED 987, ZED 1035, ZED 1098, ZED 1227 und ZED 1301 kristallisierten ebenfalls nicht im Komplex mit der Transglutaminase 2. Diese Verbindungen sind sowohl in ihrer Größe als auch in ihrem peptidomimetischen Charakter gegenüber den anderen Inhibitoren reduziert, damit sie sich besser als Arzneistoffe eignen. Bei nur geringfügig reduzierter Affinität können sie dennoch weniger Wechselwirkungen zum Protein eingehen.

Die Interaktionen der jeweiligen Inhibitoren zum symmetrieäquivalenten Molekül in der Kristallpackung wurden als Ursache in Betracht gezogen, da die Bindungsstelle der Inhibitoren diesem zugewandt ist. Jedoch bildet nur der Inhibitor ZED 28 eine Wasser-

stoffbrückenbindung zum benachbarten Molekül aus. Die Inhibitoren ZED 4 und ZED 27 gehen allenfalls von der Waals-Wechselwirkungen zum Symmetrieäquivalent ein. Somit scheint hier kein zwingender Zusammenhang zu bestehen.

Viel naheliegender ist die Vermutung, dass für die Kristallisierbarkeit eines Komplexes die Stabilisierung in der offenen Konformation durch einen Inhibitor erforderlich ist. Die Inhibition der Transglutaminase 2 durch die kovalenten Inhibitoren erfolgt zwar irreversibel, aber die in Lösung eingenommene Konformation des komplexierten Proteins bleibt unklar. Für ein geordnetes Kristallwachstum ist es jedoch erforderlich, dass sich ein Großteil der Moleküle in der Lösung in der offenen Konformation befindet. Eventuell gelingt es dabei nur den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28, die Transglutaminase 2 in dieser Geometrie zu stabilisieren. Möglicherweise nehmen die nicht kristallisierbaren Komplexe andere oder von Molekül zu Molekül sehr unterschiedliche oder mit der Zeit wechselnde Konformationen ein, so dass es ihnen nicht gelingt, einen geordneten Kristall zu bilden. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass es nicht gelang, die C277S-Mutante der Transglutaminase 2 in der offenen Konformation zu kristallisieren: Durch das Fehlen eines Inhibitors wäre diese Mutante theoretisch in der Lage, sowohl die offene als auch die geschlossene Konformation sowie Zwischenzustände einzunehmen.

Um diesem Rätsel auf die Spur zu kommen, ist es notwendig, die Konformation dieses mehrdomänigen Proteins, komplexiert mit den jeweiligen Inhibitoren, in Lösung zu bestimmen. Eine geeignete Methode zur Bestimmung einer Struktur in Lösung ist die Kleinwinkelstreuung (Small Angle X-ray Scattering). Hier werden ebenfalls Röntgenstrahlen verwendet, die unter kleinen Winkeln gebeugt werden. Aus der Verteilung der Winkel ist es dann möglich, die Größenverteilung der in der Lösung enthaltenen Moleküle zu ermitteln. Die Auflösung der erhaltenen Struktur ist im Verhältnis zur Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen relativ niedrig und erreicht maximal 15 Å. Damit könnte jedoch die Konformation der Transglutaminase 2 in Lösung hinreichend genau bestimmt werden. [139]

Um weitere Kristallstrukturen von Komplexen der Transglutaminase 2 mit weiteren Inhibitoren zu erhalten und das Protein als Zielstruktur für strukturbasiertes Design zu etablieren, muss die Problematik der inhibitorabhängigen Kristallisierbarkeit der Komplexe überwunden werden. Eine Möglichkeit wäre, die katalytische Domäne allein oder zusammen mit der β -Sandwich-Domäne herzustellen und für die Kristallisation zu verwenden. Die Stabilisierung der offenen Konformation durch die Inhibitoren würde dann

zumindest keine entscheidende Rolle mehr für die Kristallisation spielen. Problematisch wäre jedoch bei Fehlen der β -*Barrel*-Domänen die ungehinderte Aktivität der Transglutaminase 2 in der Lösung. Damit sich die Proteinmoleküle nicht schon während der Herstellung selbst miteinander vernetzen, müsste der jeweilige Inhibitor bereits zum Herstellungsansatz während der Lyse der Zellen hinzugegeben werden. So würde bereits der jeweilige Komplex aufgereinigt werden. Die Verwendung von Liganden während der Proteinaufreinigung wurde bereits in der Literatur beschrieben und führte in einigen Fällen zur Verbesserung von Stabilität und Löslichkeit des hergestellten Proteins. Die Voraussetzung dafür ist, dass der Inhibitor hinreichend löslich ist. [2] Auch die katalytische Domäne der C277S-Mutante könnte allein sicherlich einfacher kristallisiert werden, da dann in der Lösung nicht viele verschiedene Konformationen nebeneinander vorliegen können.

Eine weitere Möglichkeit wäre, die Komplexe wie zuvor herzustellen und im Anschluss die beiden β -*Barrel*-Domänen proteolytisch abzuspalten, wie bereits in der Literatur beschrieben wurde. [126] Die β -*Sandwich*-Domäne und die komplexierte katalytische Domäne könnten dann kristallisiert werden. Beide Möglichkeiten haben den Vorteil, dass der Einfluss dieser enormen Konformationsänderung im Zuge der Aktivierung auf die Kristallisation nicht mehr besteht. Jedoch müssen natürlich neue Kristallisationsbedingungen gefunden werden.

Die Kristallisation der Transglutaminase 2 in der offenen Konformation gelang bisher nur durch Komplexierung mit irreversibel bindenden, kovalenten Liganden. Diese eignen sich jedoch weniger als Arzneistoffe im Vergleich zu nicht kovalenten Inhibitoren. Ein langfristiges Ziel muss sein, die Transglutaminase 2 auch im Komplex mit letzteren zu kristallisieren, um so anhand strukturbasierten Designs Arzneistoffe als Therapeutika verschiedenster Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer und Tumorerkrankungen zu entwickeln. Problematisch dabei ist, dass für eine erfolgreiche Kristallisation die verbleibende Aktivität des Proteins in der Lösung so gering wie möglich gehalten werden muss, um eine Selbstvernetzung zu verhindern. Die Affinität der nicht kovalenten Inhibitoren zu der Transglutaminase 2 muss also entsprechend hoch sein.

Nachdem die erste Struktur eines Komplexes der Transglutaminase 2 mit einem kovalenten Inhibitor publiziert wurde [6], gelang nach Adaption der beschriebenen Methoden auch die Kristallisation mit den Inhibitoren der ZEDIRA GmbH. Bei der Sichtung der ersten erhaltenen, rautenförmigen Kristalle war die Ähnlichkeit zu dem von Pinkas et al. beschriebenen Kristallhabitus augenscheinlich: Sie wurden in der Publikation als

football-shaped beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit war also groß, dass es sich auch hier um Kristalle der Transglutaminase 2 in der offenen Konformation handelte. Die kristallographische Raumgruppe erwies sich dann auch als die gleiche wie zuvor beschrieben. Die Kristallstruktur mit dem PDB-Code 2Q3Z leistete bei der Aufklärung der drei Strukturen mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 einen wichtigen Beitrag als Modell für den Molekularen Ersatz. Dies bedeutete eine große Arbeits- und Zeitersparnis. Bei der ersten Kristallstruktur in der offenen Konformation war die relative Lage der Domänen zueinander noch unbekannt, so dass die einzelnen Domänen als Suchmodell verwendet werden mussten. Vergleichbar mit dem Bindungsmodus des Inhibitors ZED 4, bindet auch der Inhibitor in der Kristallstruktur der Gruppe von Prof. Khosla über ein Diazoketon als Kopfgruppe an das katalytisch aktive Cystein 277. Es handelt sich ebenfalls um einen peptidomimetischen Inhibitor, der größtenteils die gleichen Interaktionen zu der Transglutaminase 2 eingeht wie der Inhibitor ZED 4. Abbildung 90 zeigt eine Überlagerung der Koordinaten der beiden Inhibitoren.

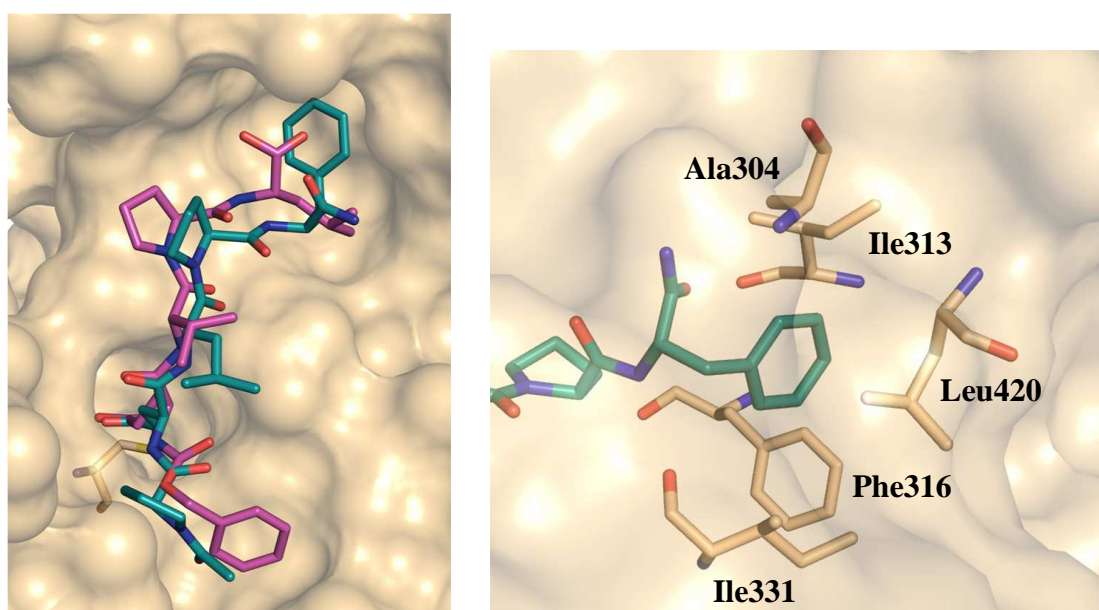


Abbildung 90: Überlagerung der Koordinaten des Inhibitors ZED 4 (violett) und dem Inhibitor der Kristallstruktur mit dem PDB-Code 2Q3Z (dunkelgrün) (links) und dessen Adressierung der hydrophoben Tasche der Transglutaminase 2 (rechts)

Wie die Abbildung zeigt, besitzt der Inhibitor der Arbeitsgruppe von Prof. Khosla einen Benzylsubstituenten am C-Terminus, der die beschriebene hydrophobe Tasche adressiert. Interaktionen werden dort zu den hydrophoben Aminosäuren Ala 304, Ile 313, Phe 316, Ile 331 und Leu 420 geknüpft. [6] Der Leucin-Rest des Inhibitor ZED 4 deutet zwar in die Richtung der hydrophoben Tasche, ragt aber im Vergleich weniger weit

hinein. Einige andere Inhibitoren, wie zum Beispiel ZED 77 und ZED 80, wurden von der ZEDIRA GmbH synthetisiert, um diese hydrophobe Tasche mit aromatischen Substituenten zu adressieren und damit die Bindungsaffinität zu steigern. Jedoch gelang es bisher aus ungeklärten Gründen nicht, einen Komplex der Transglutaminase mit einem dieser Inhibitoren zu kristallisieren.

In der von der Arbeitsgruppe von Prof. Khosla publizierten Kristallstruktur der Transglutaminase 2 liegt das Dipeptid der Aminosäuren Cys 370 und Cys 371 in oxidierte Form als Disulfidbrücke vor. Diese Verknüpfung findet sich jedoch nicht in der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 in der geschlossenen Konformation wieder. [114] In einer weiteren Publikation der Arbeitsgruppe von Prof. Khosla wird die Funktion dieser Disulfidbrücke näher beleuchtet. Die Aktivität der Transglutaminase 2 wird als redoxabhängig beschrieben: Unter zunehmend oxidativen Bedingungen erfolgt eine Inaktivierung des Enzyms. Damit zusammenhängend wird zunächst eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cys 230 und Cys 370 gebildet, die die anschließende Formation der Disulfidbrücke zwischen Cys 370 und Cys 371 erleichtern soll. Durch Untersuchungen mittels nativer Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen konnte auch ein Zusammenhang zwischen dem Bestehen der Disulfidbrücke zwischen Cys 370 und Cys 371 und der offenen Konformation sowie dem Fehlen dieser Verknüpfung und der geschlossenen Konformation der Transglutaminase 2 hergestellt werden. [140] Die Kristallstrukturen, die bis zur Veröffentlichung der Publikation erschienen waren, unterstützen diese These. Wie jedoch zuvor beschrieben, liegt das Dipeptid der Aminosäuren Cys 370 und Cys 371 in den Strukturen der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 in reduzierter Form vor. Ein weiterer Unterschied besteht in der Position der Aminosäure Cys 230: Die C α -Atome liegen um ca. 4 Å von dem in der Struktur der Arbeitsgruppe Khosla entfernt und besitzen eine größere Distanz zum Dipeptid Cys 370 – Cys 371. Die vor kurzem publizierte Kristallstruktur der Transglutaminase 2 im Komplex mit ATP in der geschlossenen Konformation zeigt im Gegensatz zur Struktur mit GDP das Vorhandensein einer Disulfidbrücke zwischen Cys 230 und Cys 370. [115] Diese Beobachtungen müssen in Zukunft in die Diskussion über den Zusammenhang zwischen den Konformationen der Transglutaminase 2 und dem Disulfidbrückenmuster einfließen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Funktion der Disulfidbrücken zwischen der redoxsensitiven Triade, bestehend aus Cys 230, Cys 370 und Cys 371, zu verstehen. Tabelle 24 gibt einen Überblick über die in den jeweiligen Kristallstrukturen beobachteten Disulfidbrücken.

Bezeichnung der Kristallstruktur	Disulfidbrücke Cys 230 – Cys 370	Disulfidbrücke Cys 370 – Cys 371
TG2 – GDP (geschlossene Konformation, PDB-Code 1KV3 [114])	-	-
TG2 – ATP (geschlossene Konformation, PDB-Code 3LY6 [115])	+	-
TG2 – Inhibitor – Komplex (offene Konformation, PDB-Code 2Q3Z [6])	-	+
TG2 – Inhibitor – Komplexe (offene Konformation, PDB-Codes 3S3J, 3S3P, 3S3S)	-	-

Tabelle 24: Übersicht über die in den Kristallstrukturen der Transglutaminase 2 beobachteten Disulfidbrücken

Die Datensammlung zur Strukturaufklärung der Kristalle der Transglutaminase 2 gestaltete sich anspruchsvoll und zeitaufwändig. Wie beschrieben, führte das Vorliegen einer langen Zellachse dazu, dass die Reflexe teilweise nicht hinreichend gut separiert vorlagen. Bei der Aufnahme weiterer Datensätze ist daher zu beachten, dass die Distanz zum Detektor so groß wie möglich gewählt wird. Jedoch muss dabei auch die zu erwartende Auflösung der Struktur in Betracht gezogen werden, damit bei einer großen Distanz zum Detektor keine Reflexe in den höheren Auflösungsschalen verloren gehen. In dem der Drehwinkel ϕ möglichst klein gewählt wird, kann zusätzlich eine bessere Separation der Reflexe erreicht werden. Der Zeitaufwand für die Datensammlung wird so allerdings erhöht. Auch die Prozessierung der Daten gestaltete sich aufgrund der beschriebenen Problematik schwierig. Das Ausprobieren verschiedener Strategien und auch verschiedener Programme ist hier notwendig, um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen. Um der Anisotropie der Daten gerecht zu werden, sollten die Datensätze in Zukunft bis zu einer höheren Auflösung prozessiert werden, auch wenn die notwendige Vollständigkeit der Daten in den höheren Auflösungsschalen nicht gegeben ist. Anschließend können die Daten mit Hilfe des Diffraction Anisotropy Servers in elliptischen Auflösungsschalen zusammengefasst und anisotrop skaliert werden. Sämtliche beschriebenen Maßnahmen sollen helfen, in Zukunft die bestmögliche Qualität der Daten zu erhalten und damit die Aussagekraft der Kristallstrukturen zu erhöhen. Die Opti-

mierung von Datensammlung und -prozessierung erfordert Zeit, genaues Hinssehen, Überlegung und schließlich auch Erfahrung, wird aber dann durch die erhöhte Qualität der Kristallstrukturen belohnt.

Vor der Publikation der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 in der offenen Konformation ließen sich über die Ausformung der Bindetasche bei Substrat- oder Inhibitorbindung allenfalls Mutmaßungen anstellen. Nun ist klar, dass sich die Bindetasche im Verlauf der Aktivierung und der Änderung der Konformation, dem sogenannten "Aufklappen", deutlich verändert. Zum Beispiel besteht die beschriebene hydrophobe Tasche in dieser Form nur in der offenen Konformation. Die Kristallstrukturen der Transglutaminase 2 mit den verschiedenen Inhibitoren können nun als Grundlage für die Anwendung computergestützter Methoden dienen. Neue Moleküle können vor ihrer Synthese zum Beispiel durch Docking erst in einer Computersimulation auf einen plausiblen Bindungsmodus getestet werden. Das Docking von kovalenten Inhibitoren ist mittlerweile in vielen Programmen, wie zum Beispiel GOLD [141], implementiert und wurde insbesondere an Cysteinproteasen als Zielstrukturen erprobt. Ein Vorteil dabei ist, dass durch die Vorgabe der kovalenten Bindung ein fester Ankerpunkt besteht. Jedoch lassen sich die erhaltenen Scoring-Werte schwierig einordnen, da der Beitrag der kovalente Bindung den größten Anteil der Bindungsaffinität ausmacht und schwierig abzuschätzen ist. [142] Die Bindetasche der Transglutaminase 2 liegt vorwiegend an der Oberfläche des Proteins, so dass viele mögliche Bindungsmodi eines flexiblen Inhibitors denkbar sind. Dies kann sich beim Docking als Schwierigkeit erweisen. Um plausible Bindungsmodi zu generieren, sind weitere Einschränkungen für die Bindung des Inhibitors durch die Einstellungen im Programm sinnvoll.

Durch die Aufklärung der Kristallstrukturen der Komplexe der Transglutaminase 2 mit den Inhibitoren ZED 4, ZED 27 und ZED 28 konnte das Design neuer Inhibitoren der ZEDIRA GmbH unterstützt werden. Die Kenntnis über die Bindungsmodi, die von den jeweiligen Inhibitoren eingegangen werden, konnte helfen, zwischen wichtigen und weniger wichtigen strukturellen Baugruppen der Moleküle zu differenzieren. Die Reduzierung der Inhibitoren in Bezug auf ihre Größe und ihren peptidomimetischen Charakter konnte unterstützt werden. Mit Hilfe des strukturbasierten Designs dieser Inhibitoren der Transglutaminase 2 wurde ein wichtiger Beitrag auf dem Weg zu einem Arzneistoff zur Behandlung insbesondere von Zöliakie-Patienten geleistet.

4 Faktor XIII

4.1 Einleitung

4.1.1 Antikoagulantien

Antikoagulantien werden zur Hemmung der Blutgerinnung zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen und Embolien sowie bei weiteren Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, z.B. dem akuten Koronarsyndrom, eingesetzt. Man unterscheidet zwischen direkten Antikoagulantien, die bestimmte Gerinnungsfaktoren deaktivieren, und indirekten Antikoagulantien, die die Synthese der Gerinnungsfaktoren herabsetzen. Als direkte Antikoagulantien inhibieren nieder- und hochmolekulare Heparine sowie verwandte Arzneistoffe die Aktivität von Thrombin (Faktor IIa) und Faktor Xa. Dabei binden sie nicht direkt an die Blutgerinnungsfaktoren, sondern beschleunigen deren Inaktivierung durch eine Wechselwirkung mit Antithrombin III. Der Wirkstoff Fondaparinux bindet ebenfalls an Antithrombin III, führt jedoch zur selektiven Inhibition des Faktor Xa und birgt nicht die Gefahr einer heparin-induzierten Thrombozytopenie, die als lebensbedrohliche Nebenwirkung bei der Therapie mit Heparinen auftreten kann. Die Therapie mit indirekten Antikoagulantien befindet sich zur Zeit im Umschwung: In den letzten Jahren wurden neue Wirkstoffe aus dieser Klasse zugelassen und einige weitere befinden sich in klinischen Studien. Auf dem Arzneimittelmarkt befinden sich bereits der Thrombin-Inhibitor Dabigatran und die Faktor Xa-Inhibitoren Rivaroxaban und Apixaban. Im Gegensatz zur Therapie mit Heparinen oder Fondaparinux besitzen diese Wirkstoffe den Vorteil, dass sie zur oralen Applikation geeignet sind.

Als indirekte Antikoagulantien werden die Wirkstoffe Phenprocoumon und Warfarin eingesetzt, die durch einen Antagonismus zu dem Cofaktor Vitamin K die Synthese von Prothrombin und der Blutgerinnungsfaktoren VII, IX und X hemmen. [143-145]

4.1.2 Der Faktor XIII

Funktion des Faktor XIII

Bei Gefäßverletzungen und Schädigungen des Endothels wird nach der primären Blutstillung der Gerinnungsprozess aktiviert. An der Blutgerinnung sind verschiedene Gerinnungsfaktoren beteiligt, die kaskadenartig proteolytisch aktiviert werden. Die Serinprotease Thrombin katalysiert die Abspaltung der Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen. Die entstandenen Fibrinmonomere aggregieren im Anschluss zu unlöslichen Fibrinpolymeren. Thrombin katalysiert ebenfalls die Aktivierung von Faktor XIII zu Faktor XIIIa, dem letzten Enzym in der Blutgerinnungskaskade. Faktor XIIIa stabilisiert die Fibrinpolymere durch kovalente Quervernetzungen und schützt den Wundverschluss durch die Bindung von α_2 -Antiplasmin vor dem fibrinolytischen Abbau durch Plasmin. Auch weitere Plasmaproteine wie zum Beispiel Fibronectin werden, katalysiert durch den Faktor XIIIa, zur Stabilisierung an den hämostatischen Fibrinpfröpf gebunden. Der Faktor XIII wird daher auch als Fibrin-stabilisierender Faktor bezeichnet. Ein genetisch bedingter oder erworbener Mangel an Faktor XIII führt zu schweren Wundheilungsstörungen und einer erhöhten Blutungsgefahr. [144, 146-148]

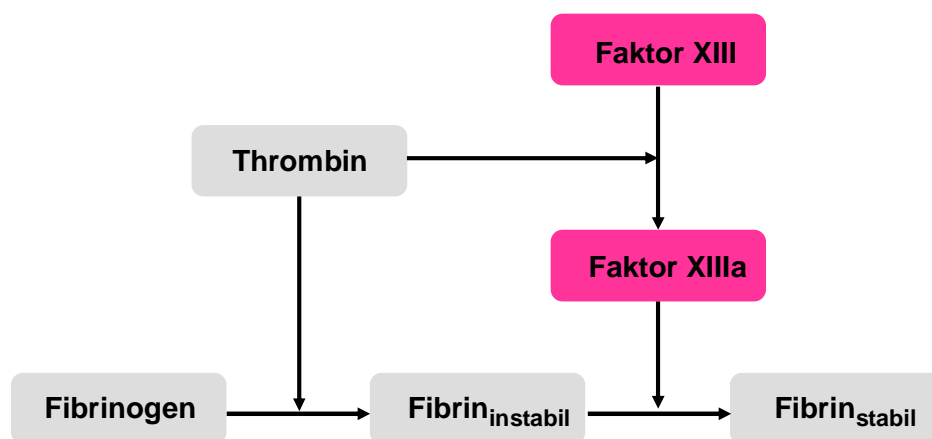


Abbildung 91: Ausschnitt aus der Blutgerinnungskaskade [149]

Die Struktur des Faktor XIII und die Aktivierung zum Faktor XIIIa

Im Blutplasma liegt der humane Faktor XIII als Heterotetramer vor, welches aus zwei A-Untereinheiten und zwei B-Untereinheiten besteht. Die B-Untereinheiten dienen zur Stabilisierung und zur Regulierung der katalytischen Aktivität der A-Untereinheiten, die die Transglutaminase-Funktion besitzen. Die Struktur des Heterotetramers und die zwi-

schen den Untereinheiten bestehenden Wechselwirkungen sind noch unbekannt. Der intrazellulär in Thrombozyten, Megakaryozyten und Thrombozyten vorkommende Faktor XIII ist ein Homodimer, gebildet aus zwei A-Untereinheiten. In dieser Form liegt auch das in dieser Arbeit verwendete rekombinant hergestellte Protein vor, im folgenden als Faktor XIII bezeichnet.

Der Faktor XIII hat ein Molekulargewicht von 83 kDa. Seine Struktur besitzt in Bezug auf die Organisation der Domänen und die Sekundärstruktur eine hohe Ähnlichkeit zur Transglutaminase 2. Jedoch besitzt der Faktor XIII zusätzlich ein N-terminales Aktivierungspeptid (Aminosäuren 1 – 37). Anschließend ist er wie die Transglutaminase 2 in vier Domänen aufgeteilt: Die β -Sandwich-Domäne (Aminosäuren 38 – 184), die katalytische Domäne (Aminosäuren 185 – 515) und die zwei C-terminalen β -Barrel-Domänen (Aminosäuren 516 – 628 sowie 629 – 731). In der katalytischen Domäne ist auch hier die katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Cys 314, His 373 und Asp 396, lokalisiert.

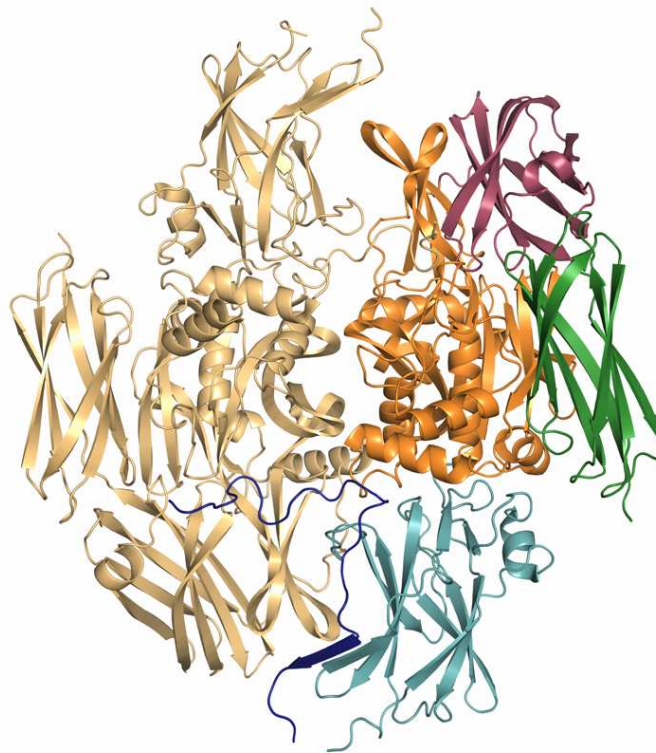


Abbildung 92: Kristallstruktur des Faktor XIII - Dimers in der geschlossenen Konformation (PDB-Code 1F13 [122]). Die β -Sandwich-Domäne des einen Moleküls (rechts) ist in hellblau, die katalytische Domäne in orange und die β -Barrel-Domänen sind in rot und grün dargestellt. Das Aktivierungspeptid ist in dunkelblau dargestellt. Es überquert die Dimerkontaktfläche und interagiert mit dem benachbarten Molekül (links), welches durchgehend in gold dargestellt ist.

Die Koordinaten der acht in der Proteindatenbank hinterlegten Kristallstrukturen des Faktor XIII in der geschlossenen Konformation [119-122] zeigen, dass, vergleichbar zur Transglutaminase 2, der Zugang zum aktiven Zentrum durch die β -Barrel-Domäne 1 blockiert ist. Die Interaktion des katalytisch aktiven Cys 314 erfolgt hier unter Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur Aminosäure Tyr 560. Das Aktivierungspeptid kreuzt die Dimer-Kontaktfläche und etabliert Interaktionen zu dem jeweiligen anderen Monomer, auch in der Nähe dessen aktiven Zentrums. Die Aktivierung des Faktor XIII zum Faktor XIIIa läuft in mehreren Schritten ab und ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Zunächst katalysiert Thrombin die Abspaltung des Aktivierungspeptids. Daraufhin diffundieren die B-Untereinheiten ab und geben die A-Untereinheiten frei. Diese werden calciumabhängig aktiviert. Vermutlich findet eine der Transglutaminase 2 vergleichbare Konformationsänderung [6] statt, bei der die β -Barrel-Domänen 1 und 2 ihre Position verändern und der Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht wird. Bei sehr hohen Calciumkonzentrationen (≥ 100 mM) kann die Aktivierung des Faktor XIII auch ohne enzymkatalysierte Abspaltung des Aktivierungspeptids erfolgen. [147, 150, 151]

Dass die Diffusion der B-Untereinheiten im Anschluss an die Abspaltung des Aktivierungspeptids erfolgt, ist in der Literatur beschrieben.[151] Jedoch findet sich bei Betrachtung der Kristallstrukturen des Faktor XIII dafür keine logische Erklärung, da das Aktivierungspeptid die beiden A-Untereinheiten miteinander verbindet. Eine Kristallstruktur des Heterotetramers könnte Aufschluss über die bestehenden Wechselwirkungen geben und gegebenenfalls weitere Details des Aktivierungsprozesses entschlüsseln. Es stellt sich die Frage, ob eine zusätzliche Funktion des Aktivierungspeptids in der Stabilisierung des Faktor XIII – Dimers besteht und ob im Zuge von dessen Abspaltung auch eine Monomerisierung erfolgt. In der Literatur wird lediglich beschrieben, dass durch die Abspaltung des Aktivierungspeptids dessen Interaktionen zum aktiven Zentrum des jeweiligen anderen Monomers aufgehoben werden können, so dass die Katalyse nicht blockiert wird. Dass der Faktor XIIIa nach proteolytischer Aktivierung als Monomer vorliegen kann, haben Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie bereits zeigen können. [152] Auch massenspektrometrische Untersuchungen eines Wasserstoff-Deuterium-Austauschs, eine Methode zur Analyse von Proteinkonformationen in Lösung, deuten auf eine Reduzierung der Interaktionen entlang der Dimer-Kontaktfläche sowohl nach proteolytischer als auch nach nicht-proteolytischer Aktivierung des Faktor XIII hin. [153] In der gängigen Literatur zu diesem Thema ist die Möglichkeit einer Monomerisierung jedoch bisher nicht beschrieben. Es stellt sich jedoch

die Frage, wie das zweite Substrat der vom Faktor XIIIa katalysierten Transamidierung zum aktiven Zentrum gelangen soll, wenn das Dimer bestehen bleibt. Wie bei der Transglutaminase 2 beschrieben, gelangt dies von der anderen Seite des katalytischen Tunnels, die nicht von dem ersten Substrat genutzt wird, zum katalytisch aktiven Cys 314. Liegt der Faktor XIII jedoch als Dimer vor, ist der dafür notwendige Raum durch das jeweilige andere Molekül versperrt.

Auch besteht keine Kenntnis darüber, was den Faktor XIIIa und auch die Transglutaminase 2 dazu veranlasst, von der geschlossenen in eine offene Konformation zu wechseln. Um die in der geschlossenen Konformation bestehenden Bindungen zwischen der katalytischen Domäne und der β -Barrel-Domäne 1 zu lösen, ist vermutlich ein hoher Energieaufwand notwendig. Die durch die Bindung der beiden Domänen vergrabene Oberfläche beträgt rund 3000 \AA^2 . [122] Im Zuge der Aktivierung wird ein Calciumion pro Molekül gebunden, jedoch zeigt die Kristallstruktur des Faktor XIII im Komplex mit Calcium lediglich kleine strukturelle Rearrangements im Bereich der Bindungsstelle. [120] Es ist eher unwahrscheinlich, dass die Bindung von Calcium allein ausreicht, um den Aktivierungsprozess auszulösen. Als weiterer potentieller Faktor kommt die Bindung eines Substrates oder Inhibitors in Frage, jedoch ist hier ebenfalls fraglich, ob der zur Konformationsänderung notwendige Energieaufwand durch die Bindung kompensiert werden kann.

Einige Details des Aktivierungsprozesses bleiben rätselhaft. Abbildung 93 zeigt schematisch einen hypothetischen Aktivierungsprozess der A-Untereinheiten des Faktor XIII unter Einbeziehung der Monomerisierung, entwickelt auf der Basis verschiedener experimenteller Beobachtungen [6, 152, 153] und eigenen Überlegungen. Die offene Konformation ist hier beispielhaft gezeigt, beruhend auf den Kristallstrukturen der Transglutaminase 2 in der offenen Konformation. Jedoch sind auch weitere Konformationen mit exponiertem aktiven Zentrum denkbar, in denen die relativen Positionen der Domänen und der Winkel, den sie einschließen, anders sind als hier dargestellt.

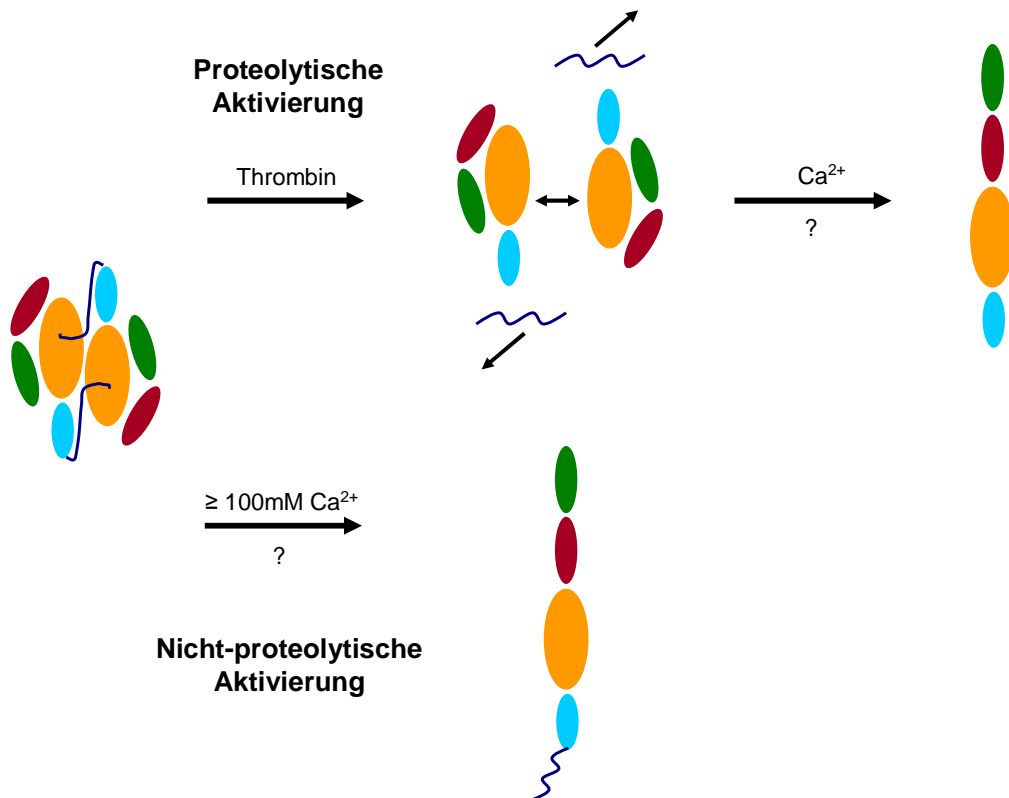


Abbildung 93: Schematische Darstellung eines hypothetischen Aktivierungsprozesses des Faktor XIII. Das Aktivierungspeptid ist in dunkelblau, die β -Sandwich-Domäne in hellblau, die katalytische Domäne in orange und die β -Barrel-Domänen sind in rot und grün dargestellt. Der bisher unbekannte Faktor im Aktivierungsprozess, der den Konformationswechsel auslöst, ist mit ? bezeichnet.

Der katalytische Mechanismus des Faktor XIII

Wie in Abschnitt 3.1.2 für die Transglutaminase 2 beschrieben, katalysiert der Faktor XIIIa substratabhängig die Deamidierung und Transamidierung von Glutaminsäureketten in Proteinen und Peptiden. Für seine physiologische Funktion ist dabei die Transamidierung von Bedeutung, durch die sogenannte Isopeptidbindungen geknüpft werden, die sehr stabil sind und sich proteolytisch nicht spalten lassen. [154, 155]

Inhibitoren des Faktor XIII

Wie in Abschnitt 3.1.2 für die Transglutaminase 2 beschrieben, können Amin-basierte Inhibitoren durch Konkurrenz mit dem natürlichen Amin-Substrat der Transamidierungsreaktion auch die Funktion des Faktor XIII hemmen. Als wirksamer Inhibitor erwies sich dabei zum Beispiel Monodansylcadaverin. [156]

Peptidomimetische Inhibitoren können von den verschiedenen Substraten des Faktor XIII abgeleitet werden. Natürliche Substrate sind unter anderem die verschiedenen Ketten des Fibrins, α 2-Antiplasmin und Fibronectin. Auch die katalytische Umsetzung

von Casein durch den Faktor XIII wurde beschrieben. Ein Vergleich der verschiedenen Substrate ergab keine strikte Konsensussequenz. [157] Die an der Katalyse beteiligte Aminosäure Glutamin einer Peptidsequenz eines solchen Substrates kann durch eine elektrophile Kopfgruppe ersetzt werden, die kovalent an das katalytisch aktive Cys 314 bindet. Die Inhibition erfolgt irreversibel. Peptidomimetische Inhibitoren mit Michael-Akzeptoren und einem Chlormethylketon als Kopfgruppe wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Weiterhin wurden verschiedene Imidazol- und Triazol-Derivate als irreversible Inhibitoren des Faktor XIII beschrieben. [158]

Ein natürlicher Inhibitor des Faktor XIII ist das Peptid Tridegin. Es besteht aus 66 Aminosäuren und wurde aus den Speicheldrüsen eines Blutegels isoliert. Der Bindungsmechanismus von Tridegin konnte bisher jedoch nicht aufgeklärt werden, jedoch scheint eine kompetitive Inhibition ausgeschlossen zu sein. [159]

Der Faktor XIII als Zielstruktur im Wirkstoffdesign

Die Kristallstruktur des Faktor XIII konnte bisher nur in der geschlossenen Konformation bestimmt werden. Um den Faktor XIII als Zielstruktur im Wirkstoffdesign zu etablieren, ist jedoch die Kristallisation des Proteins in einer offenen Konformation, möglichst im Komplex mit einem Inhibitor, erforderlich. Eine solche Struktur würde Aufschluss über die Gestaltung der Bindetasche und die Interaktionen eines Inhibitors zum Protein geben. Diese Informationen können dann für das Design neuer Inhibitoren genutzt werden. Umfangreiche Bemühungen zur Kristallisation eines Faktor XIIIa – Inhibitor Komplexes werden in dieser Arbeit beschrieben. Vergleichbar zur Transglutaminase 2, ist die Kristallisation aufgrund der Möglichkeit des Proteins, verschiedene Konformationen einzunehmen, anspruchsvoll und schwierig. So lange die strukturelle Information nicht experimentell verfügbar ist, kann als Grundlage für ein strukturbasiertes Design auch ein Homologiemodell auf der Basis der Kristallstruktur der Transglutaminase 2 in der offenen Konformation verwendet werden.

Die Inhibition des Faktor XIII stellt einen neuen Ansatz in der Therapie mit Antikoagulantien dar. Wird die Quervernetzung der Fibrinpolymere und der Einbau weiterer Proteine wie α 2-Antiplasmin gehemmt, kann das Fibringerinnsel leichter durch Plasmin abgebaut werden. Da die anderen an der Blutgerinnungskaskade beteiligten Enzyme ausschließlich Proteasen sind, könnte der Faktor XIIIa außerdem selektiv adressiert werden.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Verwendete Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Fluka und Merck erworben. Die Firma ZEDIRA GmbH, Darmstadt, die in diesem Projekt als Kooperationspartner fungierte, stellte das gesamte Proteinmaterial sowie einen Großteil der Inhibitoren zur Verfügung. Der Inhibitor MI 621 wurde von Zouhir Hammamy aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps Universität Marburg synthetisiert.

4.2.2 Kristallisation des Faktor XIII

Zur Kristallisation wurde der Faktor XIII in einer Konzentration von 4 mg/ml eingesetzt. Nachdem es initial zu einer Präzipitation des Proteins beim Auftauen nach Aufbewahrung bei -80°C gekommen war, wurde das konzentrierte Protein nicht mehr eingefroren und bei 4°C gelagert. Nach ca. einer Woche kam es jedoch auch bei dieser Temperatur zu einer Präzipitation des Proteins. Die Kristallisation erfolgte mittels der Methode der Dampfdiffusion am sitzenden Tropfen (*Sitting Drop*) bei einer Temperatur von 16 – 18°C. Es wurde ein Volumen von 1 ml Kristallisationslösung im Reservoir eingesetzt. Ein Tropfen setzte sich aus jeweils 1 µl der Proteinlösung und 1 µl der Kristallisationslösung zusammen. Es wurden Kristallisationslösungen verschiedener Zusammensetzungen im Reservoir verwendet:

1. 100 mM MES pH 6,1 – pH 6,4; 1,0 – 2,0% PEG 6000 [122]
2. 100 mM Natriumkaliumphosphat pH 6,1 – pH 6,4; 22 – 27% 1,2-Propandiol [120]
3. 100 mM Tris pH 6,2 – 6,5; 10 – 15% Ethanol [119]
4. 0,1 M – 4,0M Ammoniumsulfat pH 5,8 [121]

Als Lösungsmittel wurde, sofern nicht anders beschrieben, mittels Ionenaustausch demineralisiertes Wasser verwendet. Zur Optimierung der durch Verwendung der unter Punkt 1 beschriebenen Kristallisationslösung erhaltenen Kristalle wurde die Methode

des sogenannten *Macro-Seedings* durchgeführt. Die größten spontan gewachsenen Kristalle des Faktor XIII wurden nach einem Waschschrift in einen neuen Kristallisationsansatz überführt, in dem eine etwas niedrigere Präzipitankonzentration als zuvor verwendet vorlag.

4.2.3 *Screening* von Kristallisationsbedingungen

Das *Screening* mit Hilfe des Kristallisationsroboters zum Testen einer Vielzahl von Kristallisationsbedingungen mit Komplexen des Faktor XIIIa und kovalent gebundenen Inhibitoren wurde durchgeführt wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Außerdem wurden die Kristallisationsscreens Wizard I und Wizard II der Firma Emerald Biosystems mit jeweils 48 verschiedenen Bedingungen verwendet. Das Ansetzen erfolgte hier manuell bei 16 bis 18°C, die Kristallisationsansätze wurden im Anschluss auch bei dieser Temperatur aufbewahrt. Es wurde jeweils ein Volumen von 1 ml Kristallisationslösung im Reservoir eingesetzt. Ein Tropfen setzte sich aus jeweils 1 µl der Proteinlösung und 1 µl der Kristallisationslösung zusammen.

Pro Komplex und pro Konzentration wurden insgesamt jeweils 864 Bedingungen getestet. Das komplexierte Protein wurde nach der Herstellung nicht eingefroren und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

4.2.4 Röntgenstrukturanalyse und Strukturverfeinerung

Datensammlung und Prozessierung

Zur Vorbereitung auf die Datensammlung wurden die Proteinkristalle in eine Lösung überführt, die zu 25% aus dem Kryoprotektivum Glycerol und zu 75% aus der Reservoirlösung bestand. Anschließend wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Datensammlung erfolgte ebenfalls bei 100 K. Das Streuvermögen der Kristalle des Faktor XIII wurde am *inhouse*-Röntgendiffraktometer mit der Röntgenröhre IµS der Firma Incoatec und einem mar345-Detektor getestet. Der Datensatz eines Kristalles des Faktor XIII wurde mit Hilfe von Synchrotronstrahlung an der Beamline 14.2 des Synchrotron BESSY II, Berlin, aufgenommen. Ein Kristall eines Faktor XIIIa – Inhibitor-Komplexes wurde dort getestet. Die gesammelten Daten wurden mit dem Programmpaket HKL 2000 [62] prozessiert und skaliert.

Strukturbestimmung und Verfeinerung

Als Modell für den Molekularen Ersatz wurden die Koordinaten der Struktur mit dem PDB-Code 1F13 [122] verwendet. 5% der Daten wurden für die Berechnung des freien R-Wertes genutzt. Die Phasen wurden mittels der Methode des Molekularen Ersatzes mit Hilfe des Programms Phaser [63] bestimmt. Als Modell wurden die Koordinaten der Struktur 1F13 verwendet. Zu Beginn der Strukturverfeinerung mit dem Programm Phoenix [65] wurden ein *Rigid-Body-Refinement* und eine Optimierung durch *Simulated Annealing* bei einer Starttemperatur von 5000°C durchgeführt. Abschließend wurden für 5 Zyklen die individuellen Koordinaten und B-Faktoren verfeinert. Eine weitere Bearbeitung der Struktur erfolgte hier nicht.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

Einleitung

Zu Beginn der Arbeiten mit dem Faktor XIII waren in der Proteindatenbank die Koordinaten von acht Strukturen des Proteins in der inaktiven, geschlossenen Konformation hinterlegt. Äquivalent zu den Arbeiten mit der Transglutaminase 2 wurde auch hier zunächst versucht, die Kristallisation anhand der publizierten Bedingungen nachzustellen. Das Ziel war jedoch auch in diesem Projekt die Aufklärung der Kristallstruktur im Komplex mit einem Inhibitor, um die gewonnenen Informationen für das Wirkstoffdesign nutzen zu können. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu der Transglutaminase 2 wird erwartet, dass der Faktor XIIIa im Zuge der Aktivierung eine vergleichbare Konformationsänderung durchläuft. Die Transglutaminase 2 konnte nach Komplexbildung mit kovalent bindenden Inhibitoren bereits erfolgreich in der offenen Konformation kristallisiert werden. Bei der ZEDIRA GmbH wurde der Faktor XIII mittels Thrombin zu Faktor XIIIa aktiviert und mit verschiedenen, kovalent bindenden Inhibitoren komplexiert. Ein Komplex des Faktor XIIIa mit einem nicht peptidomimetischen, kleinmolekularen Inhibitor ließ sich nicht auf eine für die Proteinkristallisation hinreichende Konzentration einstellen. Der Komplex präzipitierte während des Konzentrationsvorgangs aus der Lösung. Eine hinreichende Konzentrierung gelang schließlich, nachdem der Faktor XIIIa mit peptidomimetischen, von Substraten abgeleiteten Inhibitoren komplexiert worden war. Die Inhibitoren der ZEDIRA GmbH binden, analog zur Transglutaminase 2, über einen Michael-Akzeptor an das katalytisch aktive Cystein 314. Ihre Strukturformeln werden aus Gründen der Geheimhaltung in dieser Arbeit nicht abgebildet. Ein weiterer Inhibitor des Faktor XIII, MI 621, der als Kopfgruppe ein Chlormethylketon besitzt, wurde ebenfalls zur Komplexbildung eingesetzt. Seine Strukturformel zeigt Abbildung 94.

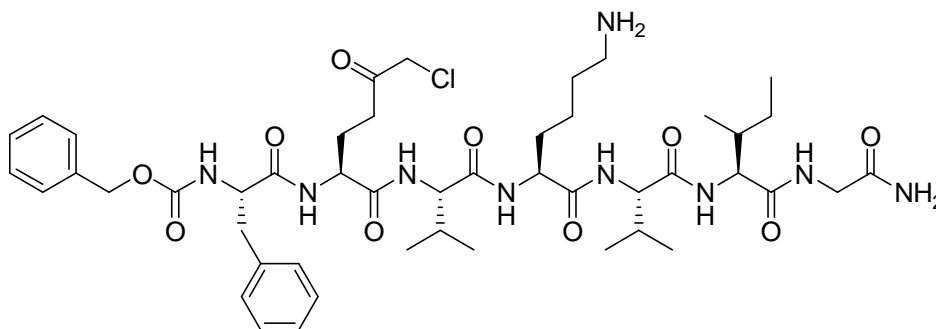


Abbildung 94: Strukturformel des Inhibitors MI 621

Die Bindung eines Chlormethylketons an den Faktor XIIIa erfolgt vergleichbar zu der eines Inhibitors mit einer Diazoketon-Kopfgruppe. Der Bindungsmechanismus ist in Abbildung 95 gezeigt.

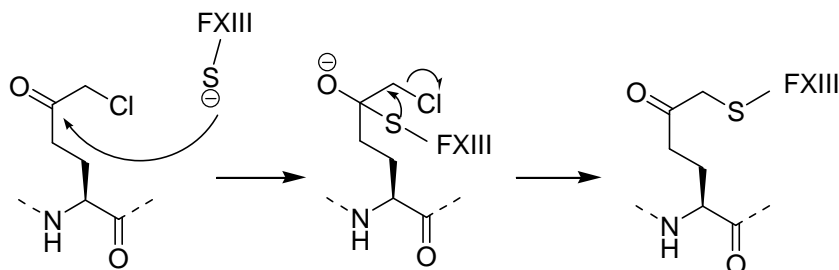


Abbildung 95: Mechanismus der Bindung der Inhibitoren mit einem Chlormethylketon als Kopfgruppe an den Faktor XIIIa [160, 161]

Diese Komplexe wurden in umfangreichen *Screenings* eingesetzt, um passende Kristallisationsbedingungen zu finden. Die erste Kristallstruktur eines solchen Komplexes kann als Meilenstein in der Suche nach einem Inhibitor des FXIII als Arzneistoff zur Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen betrachtet werden.

Ergebnisse

Kristallisation des Faktor XIII

Zur Kristallisation des Faktor XIII in der geschlossenen, inaktiven Konformation waren zum entsprechenden Zeitpunkt vier verschiedene Bedingungen beschrieben. [119-122] Diese wurden umfassend getestet, um herauszufinden, welche Kristallisationsbedingungen zu den am besten geeigneten Kristallen führten. Unter Verwendung der in Punkt 1 beschriebenen Bedingungen wuchsen innerhalb eines Tages Kristalle heran, wie sie in Abbildung 96 beispielhaft gezeigt werden.



Abbildung 96: Fotos von Kristallen des Faktor XIII, die durch Verwendung der unter Punkt 1 beschriebenen Kristallisationsbedingungen erhalten wurden

Die unter Punkt 2 beschriebenen Kristallisationsbedingungen führten nicht zu einer Kristallisation des FXIII. Jedoch konnten in den Ansätzen, in denen die unter Punkt 3 beschriebenen Kristallisationslösungen verwendet wurden, nach einigen Tagen kleine nadelförmige Kristalle beobachtet werden. In der Publikation der unter Punkt 4 beschriebenen Kristallisationsbedingungen fehlte die Angabe der verwendeten Konzentration von Ammoniumsulfat, so dass ein breiter Konzentrationsbereich getestet wurde. Unter Verwendung von 0,2 M Ammoniumsulfat wuchs nach einer Woche ein einzelner Kristall heran.

Die Kristalle, die mit den in Punkt 1 und 4 beschriebenen Kristallisationsbedingungen erhalten wurden, wurden auf am *inhouse*-Röntgendiffraktometer auf ihr Diffraktionsvermögen getestet. Die Kristalle aus der unter Punkt 1 beschriebenen Bedingung beugten die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 3.0\AA . Durch *Macro-Seeding* wurde die Größe der Kristalle weiter optimiert, so dass sie im Anschluss für eine Datensammlung verwendet werden konnten. Der unter Verwendung der in Punkt 4 beschriebenen Kristallisationsbedingungen erhaltene Kristall erreichte eine Diffraktion mit Auflösung

von 6.7Å. Diese und die unter Punkt 3 beschriebene Kristallisationsbedingung hätten optimiert werden müssen, um für eine Datensammlung geeignete Kristalle zu liefern. Da jedoch bereits geeignete Kristalle vorhanden waren, wurde aus Zeitgründen darauf verzichtet.

Datensammlung und Strukturaufklärung des FXIII

Von einem Kristall des Faktor XIII konnte an der Beamline 14.2 des Synchrotron BESSY II, Berlin, ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.78Å gesammelt werden. Nach ihrer Prozessierung konnte den Daten durch die Methode des Molekularen Ersatzes die monokline Raumgruppe $P2_1$ zugeordnet werden, die auch schon in einigen publizierten Kristallstrukturen des Faktor XIII beobachtet wurde. Die asymmetrische Einheit des Kristalls enthält vier Monomere des Faktor XIII.

Nach den ersten Schritten der Strukturverfeinerung wurde diese zunächst nicht weitergeführt. Da die asymmetrische Einheit 2924 Aminosäuren enthält, die sämtlich manuell in die Elektronendichtekarte eingepasst werden müssen, ist der Zeitaufwand für die Fertigstellung der Kristallstruktur sehr hoch. Abbildung 97 veranschaulicht die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Die Struktur des Faktor XIII in der geschlossenen Konformation wurde außerdem bereits mehrfach publiziert, die Kristallstruktur mit dem PDB-Code 1EX0 [123] weist dabei mit 2.0Å die höchste Auflösung auf. Ein zusätzlicher Nutzen und Informationsgewinn wäre allenfalls durch eine neue Struktur mit signifikant höherer Auflösung als die der bisher publizierten Strukturen zu erwarten.

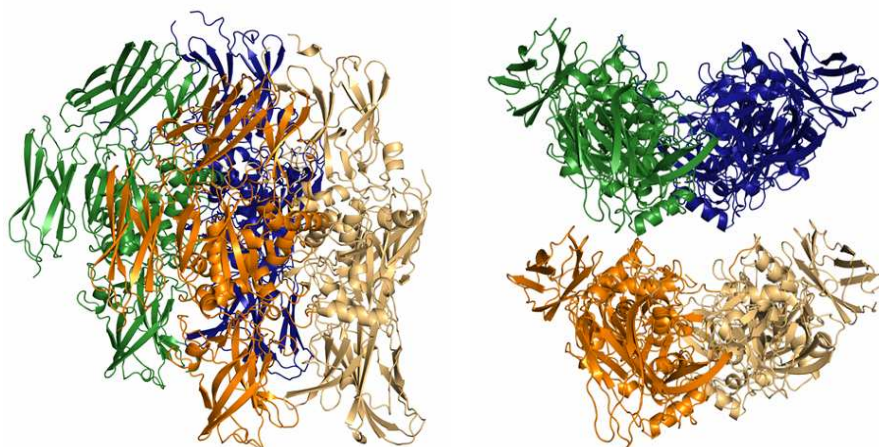


Abbildung 97: Die asymmetrische Einheit des Kristalls enthält vier Moleküle des Faktor XIII, dargestellt in grün, blau, orange und gold, aus zwei verschiedenen Perspektiven

Kristallisation von Komplexen des Faktor XIIIa mit kovalent gebundenen Inhibitoren

Verschiedene Komplexe des Faktor XIIIa mit kovalent gebundenen Inhibitoren wurden in *Screenings* zur Suche nach passenden Kristallisationsbedingungen eingesetzt. Tabelle 25 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Komplexe.

Bezeichnung des Inhibitors	Konzentration der eingesetzten Lösung des Komplexes	Hersteller des Inhibitors
ZED 794	2,0 mg/ml	ZEDIRA GmbH
ZED 1246	6,0 mg/ml 8,5 mg/ml	ZEDIRA GmbH
ZED 1265	3,5 mg/ml 7,0 mg/ml 10,0 mg/ml	ZEDIRA GmbH
ZED 1301	2,0 mg/ml 15,5 mg/ml	ZEDIRA GmbH
ZED 1390	7,0 mg/ml	ZEDIRA GmbH
MI 621	3,3 mg/ml	Arbeitsgruppe Prof. Steinmetzer

Tabelle 25: Übersicht über die in *Screenings* eingesetzten Komplexe des Faktor XIIIa mit kovalent gebundenen Inhibitoren

Zusätzlich zu den umfangreichen *Screening*-Ansätzen wurde versucht, die Komplexe unter Verwendung der zur Kristallisation der inhibierten Transglutaminase 2 in der offenen Konformation eingesetzten Bedingungen zu kristallisieren. Auch die Kristallisationsbedingungen, unter deren Verwendung der Faktor XIII in der geschlossenen Konformation kristallisierte, wurden getestet. Es konnte jedoch jeweils kein Kristallwachstum festgestellt werden.

Die Komplexe des Faktor XIIIa wurden in unterschiedlichen Konzentrationen im *Screening* eingesetzt. Bei Verwendung der Komplexe in einer Konzentration von 7,0 mg/ml und 8,5 mg/ml wurde in etwa 50% der Tropfen eine Präzipitation beobachtet,

so dass dieser Konzentrationsbereich als bevorzugt für eine erfolgreiche Kristallisation betrachtet werden kann.

Unter einigen Kristallisationsbedingungen des *Screenings* wuchsen kleine Kristalle heran, die jedoch zumeist durch Testen am *inhouse*-Röntgendiffraktometer als Salzkristalle identifiziert wurden. In einem Tropfen, der den Komplex des Faktor XIIIa mit dem Inhibitor MI 621 enthielt, wurden plättchenförmige Kristalle entdeckt, die miteinander verwachsen waren. Da eine Trennung der Kristalle aufgrund ihrer Größe und Instabilität nicht möglich war, wurden die verwachsenen Kristalle im Verbund entnommen und mit Hilfe von Synchrotronstrahlung getestet. Das beobachtete Diffraktionsmuster mit einer Auflösung von 3.2Å deutet darauf hin, dass es sich hierbei um Proteinkristalle handelt. Die Raumgruppe und die Zellkonstanten ließen sich jedoch vermutlich aufgrund der Überlagerung mehrerer Kristalle nicht bestimmen.

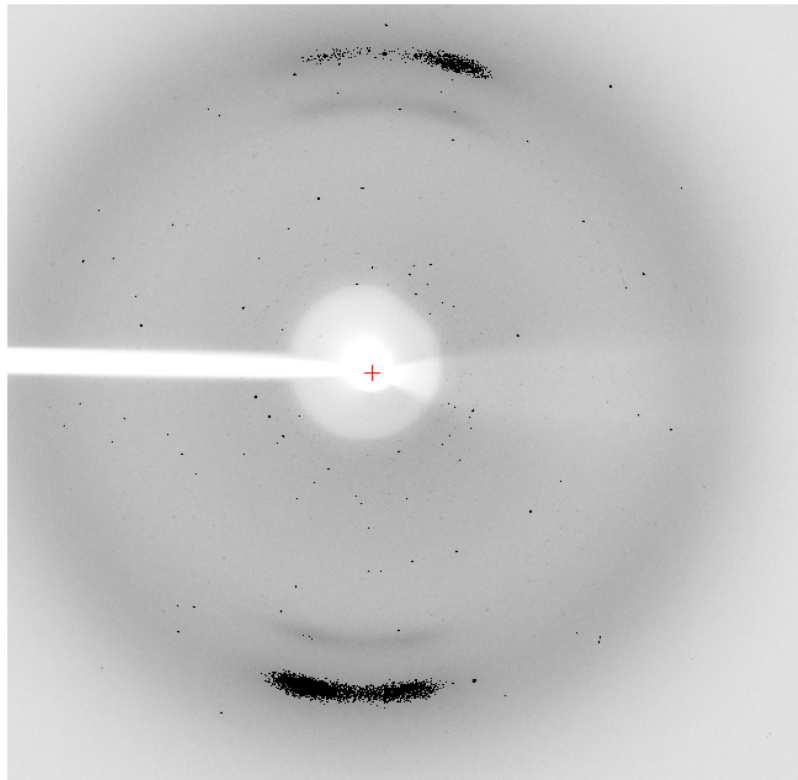


Abbildung 98: Diffraction eines Kristallverbunds aus potentiellen Kristallen eines Faktor XIIIa – Inhibitor – Komplexes

Zusammenfassung und Diskussion

Die Kristallisation des Faktor XIII in der inaktiven, geschlossenen Konformation konnte erfolgreich unter Verwendung von bereits publizierten Kristallisationsbedingungen reproduziert werden. Ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.78Å konnte gesammelt werden. Da jedoch zahlreiche Strukturen des Proteins in dieser Konformation bereits publiziert wurden und die höchste Auflösung einer dieser Strukturen mit 2.0Å nicht signifikant schlechter ist, wurde aufgrund des hohen Zeitaufwands die Verfeinerung der Kristallstruktur nicht zu Ende geführt. Um eine Kristallstruktur mit einer signifikant höheren Auflösung und damit einen deutlichen Informationsgewinn zu erhalten, könnten die bisher verwendeten oder die unter Punkt 2 und 4 beschriebenen Kristallisationsbedingungen weiter optimiert werden. Größere Kristalle oder Kristalle, deren Wachstum verlangsamt wurde, könnten zu einer verbesserten Diffraktion führen. Gegebenenfalls könnte durch das Testen mehrerer Kristalle auch ein Kristall gefunden werden, in dem die asymmetrische Einheit nur zwei anstelle von vier Molekülen enthält, wie in den bereits publizierten Kristallstrukturen. So würde sich der Zeitaufwand für die Strukturverfeinerung nahezu halbieren.

Zahlreiche Komplexe des Faktor XIIIa mit kovalent gebundenen Inhibitoren wurden in umfangreichen *Screenings* eingesetzt, um Kristallisationsbedingungen für das inhibierte Protein zu finden. Dass im Zuge der Aktivierung wohl ein der Transglutaminase 2 vergleichbarer Konformationswechsel eintritt, lässt die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Proteine vermuten. Ein weiterer Hinweis auf eine veränderte Konformation der Inhibitor Komplexe ist, dass die Komplexe unter Verwendung der Kristallisationsbedingungen für das Protein in der geschlossenen Konformation nicht kristallisieren. Da sich die Kristallisation der Komplexe der Transglutaminase 2 als stark inhibitorabhängig erwiesen hatte, wurden Komplexe mit verschiedenen Inhibitoren im *Screening* eingesetzt. Auch die Konzentration der Lösungen der eingesetzten Komplexe wurde variiert. Hier bestehen für die Zukunft noch Möglichkeiten zur Variation: Komplexe mit weiteren Inhibitoren können in unterschiedlichen Konzentrationen im *Screening* eingesetzt werden. Auch eine Erweiterung des Repertoires an *Screening*-Lösungen ist denkbar.

Die Kristalle des Komplexes des Faktor XIIIa mit dem Inhibitor MI 621 sind der erste sogenannte "Hit" aus dem *Screening* zur Suche nach Kristallisationsbedingungen für den inhibierten Faktor XIIIa und stellen einen großen Schritt auf dem Weg zur Kristallstrukturbestimmung dar. Die Reproduktion der Kristalle wird in nachfolgenden Arbeiten durchgeführt.

Welche Probleme sich in Folge während der Etablierung des Faktor XIIIa als Zielstruktur im Wirkstoffdesign ergeben können, wurde für die Transglutaminase 2 in Abschnitt 3.3 ausführlich diskutiert. Auch die Kristallisation des Faktor XIIIa kann sich aus den gleichen Gründen als inhibitorabhängig erweisen. Strategien zur Überwindung dieser Problematik, wie zum Beispiel die Kristallisation der Inhibitoren im Komplex mit der katalytischen Domäne, sind auch hier denkbar. Eine Abtrennung der beiden C-terminalen β -Barrel-Domänen kann durch Thrombin katalysiert werden, da eine zusätzliche Spaltstelle zwischen Lys 513 und Ser 514 beschrieben wurde. [147] Werden Datensätze von Komplexen des gesamten Faktor XIIIa – Moleküls in einer der Transglutaminase 2 vergleichbaren offenen Konformation aufgenommen, wird die Datensammlung und –auswertung vermutlich ebenso problematisch und anspruchsvoll sein wie bei der Transglutaminase 2 beschrieben.

Die ersten Schritte auf dem Weg zu einer Kristallstruktur des Faktor XIIIa im Komplex mit einem Inhibitor sind getan. Bis jedoch die Strukturaufklärung vollendet ist, können computergestützte Methoden helfen, die Bindetasche und den Bindungsmodus der Inhibitoren zu simulieren. Aufgrund der hohen strukturellen und sequentiellen Ähnlichkeit der beiden Proteine kann eine Kristallstruktur der Transglutaminase 2 in der offenen Konformation als Grundlage für die Erstellung eines Homologiemodells des Faktor XIIIa dienen. Ein Vergleich der in der UniProt-Datenbank [162] hinterlegten Sequenzen des Faktor XIII (Eintrag P00488) und der Transglutaminase 2 (Eintrag P21980) mit dem Programm BLAST [163] ergibt eine Sequenzidentität von 39 % und eine Sequenzähnlichkeit von 53 %. Insbesondere der Bereich um das katalytisch aktive Cystein ist stark konserviert, wie Abbildung 99 zeigt. Ein solches Homologiemodell wurde bereits in der Literatur beschrieben. [150] Jedoch wurde bei diesen Arbeiten vorausgesetzt, dass der Faktor XIIIa auch in der aktiven Konformation als Dimer vorliegt. So wird auch beschrieben, dass bei der Erstellung des Modells Zusammenstöße zwischen der β -Barrel-Domäne 1 und der β -Sandwich-Domäne des jeweiligen anderen Monomers auftraten. Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie konnten jedoch zeigen, dass der Faktor XIIIa in seiner aktiven Konformation vorwiegend als Monomer vorliegt. [152] Dafür spricht auch die Rolle des Aktivierungspeptids, welches in der inaktiven Konformation die beiden Moleküle des Dimers verbindet. Nach dessen Abspaltung kann eine Aktivierung des Proteins und auch eine Monomerisierung erfolgen. Dies muss bei der Erstellung eines Homologiemodells berücksichtigt werden. Das erhaltene Modell sollte durch Moleküldynamiksimulation verbessert werden, so dass im

Anschluss die Bindetasche für das Docking von Inhibitoren verwendet werden kann.
[164]

FXIII	59	DTNKVDHHTDKYENNKLIIVRRGQSFYVQIDF-SRPYDPRRDLFRVEYVIGRYPQENKGT	117
		+TN DHHT KL+VRRGQ F++ + F R Y+ D V G P + GT	
TG2	15	ETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWLTLHFEGRNYEASVDSLTFSSVVTGPAPSQEAGTK	74
FXIII	118	IPVPIVSELQSGKWGAKIVMREDRSVRLSIQSSPKCIVGKFRMYVAVWTPYGVLRTSRNP	177
		P+ ++ G W A +V ++D ++ L + + +G +R+ + T Y + S	
TG2	75	ARFPLRDAVEEGDWTATVVDQQDCTLSTLQLTTPANAPIGLYRLSLEASTGY---QGSSFV	131
FXIII	178	ETDTYILFNPWCEDDAVYLDNEKEREYVLDIGVIFYGEVNDIKTRSWSYQGQFEDGILD	237
		+LFN WC DAVYLD+E+ER+EYVL G I+ G IK W++GQFEDGILD	
TG2	132	LGHFILLFNAWCPADAVYLDSEERQEYVLTQQGFYIYQGSQAFIKNIPWNFGQFEDGILD	191
FXIII	238	TCLYVMD-----RAQMDLSGRGNPIKVSRRVGSAMVNAKDDEGVLVGSWDNIYAYGVPP	290
		CL ++D A D S R +P+ V RV S MVN DD+GVL+G WDN Y GV P	
TG2	192	ICLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSPVYVGRVSGMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGVSP	251
FXIII	291	SAWTGSVDILLEYSRSE-NPVRYGQ ^C WVFAGVFNTFLRCLGIPARIVTNYFSAHDNDANL	349
		+W GSVDIL +++ V+YGQ ^C WVFA V T LRCLGIP R+VTNY SAHD ++NL	
TG2	252	MSWIGSVDILRRWKNHGCQRVKYGQ ^C WVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTNYNSAHDQNSNL	311
FXIII	350	QMDIFLEEDGNVNSKLTKDSVWNYHCWNEAWMTRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DGM	409
		++ F E G + + +WN+HCW E+WMTRPDL G+ GWQA+D TPQE S+G Y	
TG2	312	LIEYFRNEFGEIQGD-KSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGTYC	370
FXIII	410	CGPASVQAIAKHGHVCFQFDAPFVFAEVNSDLIYITAKKDGHVVENVDATHI-GKLIVTK	468
		CGP V+AIK G + ++DAPFVFAEVN+D++ + DG+ V ++++ + I G I TK	
TG2	371	CGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDGS-VHKSINRSLIVGLKISTK	429
FXIII	469	QIGGDGMMDITDITYKFQEGQEERLALETA--LMYGAKKPLNTEGVMKSRSNVDMDFEVE	526
		+G D DIT TYK+ EG EER A A L A+K T M+ R M+	
TG2	430	SVGRDEREDITHYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKE-ETGMAMRIRVGQSMN----	484
FXIII	527	NAVLGKDFKLSITFRNNSHNYTITAYLSANITFYTGVPKAEF-KKETFDVTLEPLSFKK	585
		+G DF + NN+ Y L A Y G+ E K ++ LEP S K	
TG2	485	---MGSDFDVFAHITNNTAEYVCRLLLCARTVSYNGILGPECGTKYLLNLNLEPFSEKS	541
FXIII	586	EAVLIQAGEYMGQLEQASLH---FFVTARINETRDVLAKQKSTVLTIPETIIKVRGTQV	642
		+ I +Y L E + V IN L ++ L PEI I++ G	
TG2	542	VPLCILYEKYRDCLTESNLIKVRALLVEPVIN--SYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPK	598
FXIII	643	VGSDMTVTVQFTNPLKETLRNVVHLDGPGVTRPMKKMFREIRPNSTVQWEEV-----CR	697
		+ V NPL L ++G G+T K + EI P+ EEV	
TG2	599	QKRKLVAEVSQNPPLPVALEGCTFTVEGAGLTEEQKTV--EI-PDPVEAGEEVKVRMDLL	655
FXIII	698	PWVSGHRKLIASMSDSL RHVYGELDVQI	726
		P G KL+ + SD L+ V G +V I	
TG2	656	PLHMGLHKLVVNFESDKLKAVKGFRNVII	684

Abb. 99: Vergleich der Sequenzen von Faktor XIII und Transglutaminase 2 mit dem Programm BLAST. [163] Das katalytisch aktive Cystein ist jeweils rot markiert.

Der Einsatz kovalent bindender Inhibitoren zur Komplexierung des Faktor XIII muss als Mittel auf dem Weg zu einer erfolgreichen Kristallisation des Proteins in der aktiven Konformation betrachtet werden. Durch die kovalente Bindung der Inhibitoren erhöht sich die Stabilität der Komplexe und damit die Wahrscheinlichkeit ihrer Kristallisier-

barkeit. Wie für die Transglutaminase 2 beschrieben, eignen sich kovalente Inhibitoren jedoch weniger als Arzneistoffe als nicht kovalente Inhibitoren. Insbesondere Inhibitoren mit einer Chlormethylketon-Kopfgruppe gelten als sehr reaktiv. Neben Transglutaminasen und Cysteinproteasen gehen sie auch Bindungen zu Serinproteasen und anderen SH-haltigen Molekülen, wie zum Beispiel Glutathion, ein. Aufgrund diesem Mangel an Selektivität wäre eine Anwendung dieser Moleküle in vivo nicht möglich. Somit muss auch hier das strukturbasierte Design nicht kovalenter Inhibitoren als langfristiges Ziel betrachtet werden, damit diese eines Tages zur antikoagulativen Therapie eingesetzt werden können.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird das strukturbasierte Design von Wirkstoffen am Beispiel drei verschiedener Zielproteine beschrieben: Der HIV-1 Protease und der humanen Proteine Transglutaminase 2 und Blutgerinnungsfaktor XIII. Ziel der Arbeit war, die jeweiligen Proteine im Komplex mit ihren Inhibitoren zu kristallisieren und die dreidimensionale Struktur der Komplexe mittels Röntgenstrukturanalyse zu bestimmen. Die erhaltenen Informationen über den Bindungsmodus der Inhibitoren sollten für das Design neuer Moleküle und die Optimierung der Bindungseigenschaften, zum Beispiel der Affinität zum Protein, genutzt werden, um somit einen Beitrag zur Entwicklung neuer Arzneistoffe zu leisten.

Inhibitoren der HIV-1 Protease sind potentielle Arzneistoffe zur Therapie von HIV-infizierten Menschen. Sie können helfen, die Zeit bis zum Ausbruch der Immunschwäche-Krankheit AIDS zu verlängern sowie deren Symptomatik zu lindern. Auch wenn bereits einige Arzneistoffe zur Behandlung zur Verfügung stehen, erfordert die zunehmende Resistenzbildung der Viren und die Entwicklung von AIDS zu einer weltweiten Pandemie eine kontinuierliche Weiterentwicklung der Therapie. Die humane Transglutaminase 2 ist unter anderem an der Pathogenese der Zöliakie beteiligt, zu deren Therapie zur Zeit keine Arzneimittel zur Verfügung stehen. Ein Medikament mit einem Inhibitor der Transglutaminase 2 könnte Patienten, die von dieser Gluten-Unverträglichkeit betroffen sind, ermöglichen, ihre strikte Diät aufzulockern, und somit ihre Lebensqualität beträchtlich erhöhen. Auch der Faktor XIII gehört zu der Familie der Transglutaminasen. Durch seine Funktion in der Blutgerinnung stellt er einen Angriffspunkt für eine antikoagulative Therapie dar. Inhibitoren des Proteins sind daher potentielle Arzneistoffe und eine neue Option zur Prophylaxe und Behandlung verschiedenster Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie zum Beispiel von Thrombosen und Embolien.

In Abschnitt 2.3 dieser Arbeit werden Kristallstrukturen von Komplexen der HIV-1 Protease mit verschiedenen Inhibitoren vorgestellt, die als Grundstruktur ein sekundäres Amin besitzen. Zunächst wird in Abschnitt 2.3.1. gezeigt, wie innerhalb einer Serie strukturell sehr ähnlicher Inhibitoren grundlegend verschiedene Bindungsmodi zum Protein beobachtet werden konnten, die in Zusammenhang mit der Kristallform und der Raumgruppe des Kristalls stehen. Dass der gleiche Inhibitor in Kristallen mit unterschiedlicher Raumgruppe sowohl C2-symmetrisch als auch asymmetrisch an die HIV-1

Protease binden kann, wird in Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Der Zusammenhang zwischen Bindungsmodus des Inhibitors, Symmetrie und Raumgruppe wird dort noch einmal ausführlich diskutiert. In Abschnitt 2.3.3 und 2.3.4 wird beschrieben, wie Moleküle mit Fulleren- und Piperidin-Grundgerüst durch enzymkinetische Messungen als neue Inhibitoren der HIV-1 Protease charakterisiert werden konnten. Strukturelle Informationen über den Bindungsmodus dieser Inhibitoren konnten jedoch nicht erhalten werden. Jedoch konnte der Bindungsmodus einer Serie dreiarmer, nicht symmetrischer Pyrrolidinderivate durch Co-Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden, wie in Abschnitt 2.3.5 gezeigt wird. Eine Weiterentwicklung der Amin-basierten Inhibitoren stellen die bizyklischen Pyrrolidinderivate dar, deren Bindungseigenschaften in Abschnitt 2.3.6 vorgestellt werden. Kristallstrukturen von Komplexen mit diesen Inhibitoren stellten auch die Grundlage für ein Fragment-basiertes Design dar, welches in Abschnitt 2.3.7 beschrieben wird.

Die Transglutaminase 2 wurde, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, im Komplex mit kovalent bindenden Inhibitoren in der offenen Konformation des Proteins kristallisiert. Die Kristallisierbarkeit dieser Komplexe erwies sich als stark abhängig vom verwendeten Inhibitor. Es gelang jedoch schließlich, Kristallstrukturen von drei verschiedenen Komplexen zu bestimmen. Die Strukturaufklärung vermittelte wertvolle Informationen über den Bindungsmodus der Inhibitoren, die von dem Kooperationspartner in diesem Projekt, der ZEDIRA GmbH, als Grundlage für das Design weiterer Moleküle auf dem Weg zu einem geeigneten Arzneistoff genutzt werden konnten.

Vergleichbar zu den Arbeiten mit der Transglutaminase 2, sollte auch der Faktor XIIIa im Komplex mit einem kovalent bindenden Inhibitor kristallisiert und anschließend erstmals die dreidimensionale Struktur des Proteins in einer offenen Konformation bestimmt werden. Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, konnte das Protein zunächst erfolgreich in der geschlossenen Konformation kristallisiert werden. Anschließend wurden zahlreiche Komplexe des Faktor XIIIa mit kovalent gebundenen Inhibitoren in umfangreichen *Screenings* eingesetzt, um Kristallisationsbedingungen für das inhibierte Protein zu finden. Am Ende dieser Arbeit konnten erste Kristalle eines Komplexes erhalten und auf ihr Diffraktionsvermögen getestet werden, so dass ein großer Schritt auf dem Weg zur Kristallstruktur getan wurde.

Summary

The thesis at hand uses the example of three different target proteins to describe structure-based design of drugs, the first being HIV-1 protease, the second and third being the human proteins transglutaminase 2 and coagulation factor XIII. The aim of this thesis was to crystallize the respective proteins in complex with their inhibitors and to determine the three-dimensional structure of the complexes by X-ray analysis. The resulting information about the binding mode of the inhibitors could then be used for the design of new molecules and the optimization of binding properties, for example the affinity to the protein. In this way, a contribution to the development of new drugs has been made.

Inhibitors of HIV-1 protease are potential drugs for the treatment of HIV-infected patients. They might help slowing down the ongoing infection and later relieve the symptoms of AIDS. Even though a variety of drugs is already available, the increasing resistance development of the virus and the worldwide spreading of AIDS up to a pandemic require permanent efforts to develop new therapeutics.

Among other things, human transglutaminase 2 contributes to the pathogenesis of celiac disease. At the moment, there are no drugs available to treat this gluten intolerance. An inhibitor of transglutaminase 2 would be a potential drug allowing affected patients making their gluten-free diet less strict and thus increasing their quality of life.

Coagulation factor XIII is also a member of the family of human transglutaminases. Because of its function in blood coagulation, the protein could be a target for an anticoagulation therapy. Inhibitors of factor XIII are therefore potential drugs and a new option in prophylaxis and therapy of several cardiovascular diseases like thrombosis and embolism.

Section 2.3 of this thesis presents several crystal structures of complexes of HIV-1 protease with inhibitors having a secondary amine as core structure. The observation of a significant difference in binding modes in a series of structurally similar ligands, in relation to the crystal form and the space group of the crystals, is reported in section 2.3.1. The occurrence of two different binding modes of the same inhibitor to HIV-1 protease, once C₂-symmetric, once without twofold symmetry, is shown in section 2.3.2. Here, the relationship between the inhibitor's binding mode, symmetry and space group, is discussed in detail. Section 2.3.3 and 2.3.4 describe the characterization of molecules

with a fullerene as well as with a piperidine core scaffold as novel inhibitors of HIV-1 protease by enzyme kinetic measurements. It was not possible, however, to obtain structural information about the binding mode of these inhibitors. Nevertheless, as shown in section 2.3.5, the binding mode of a series of three-armed, non-symmetric pyrrolidine-based inhibitors was determined by crystallization of the complexes and subsequent X-ray analysis. Pyrrolidine-based bicyclic inhibitors are an advancement of the amine-based HIV-1 protease inhibitors. Their binding properties are shown in section 2.3.6. Crystal structures of complexes with these inhibitors were the basis for a fragment-based approach, which is described in section 2.3.7.

Human transglutaminase 2 was crystallized in complex with covalently bound inhibitors in the open conformation of the protein, as shown in section 3.3. The success of crystallization of these complexes turned out to be highly dependent on the type of the inhibitor. Nevertheless, crystal structures of three different complexes were determined finally. The structural analysis provided useful information about the binding mode of the inhibitors, which proved of value for the design of new molecules to be developed into an applicable drug by the cooperation partner in this project, ZEDIRA GmbH.

As with transglutaminase 2, the aim was to crystallize coagulation factor XIII in complex with a covalently bound inhibitor and to determine the three-dimensional structure of the protein in the open conformation for the first time ever. As described in section 4.3, the protein was crystallized successfully in the closed conformation at first. Afterwards, a large number of complexes of factor XIIIa with covalently bound inhibitors were applied in extensive screenings to find crystallization conditions for the inhibited protein. To this end, promising crystals of a complex were obtained and tested for diffraction power. Thus, a great milestone on the way to a crystal structure has been accomplished.

Literaturverzeichnis

1. Anderson, A.C., *The process of structure-based drug design*. Chem Biol, 2003. **10**(9): p. 787-97.
2. Hassell, A.M., An, G., Bledsoe, R.K.; Bynum, J.M., Carter, H.L., Deng, S.J., Gampe, R.T., Grisard, T.E., Madauss, K.P., Nolte, R.T., Rocque, W.J., Wang, L., Weaver, K.L., Williams, S.P., Wisely, G.B., Xu, R., and L.M. Shewchuk, *Crystallization of protein-ligand complexes*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007. **63**(Pt 1): p. 72-9.
3. Acharya, K.R. and M.D. Lloyd, *The advantages and limitations of protein crystal structures*. Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(1): p. 10-4.
4. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., and M. Jaskolski, *Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures*. FEBS J, 2008. **275**(1): p. 1-21.
5. Borman, S., *Enzyme opens for business*. C&En News, 2008. **86**(1): p. 24.
6. Pinkas, D.M., Strop, P., Brunger, A.T., and C. Khosla, *Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation*. Plos Biology, 2007. **5**(12): p. e327.
7. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauter, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and L. Montagnier, *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
8. Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen, *Molekulare Virologie*. Vol. 2. 2003, Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
9. UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) *Global report*. 2010.
10. Klimas, N., A.O. Koneru, and M.A. Fletcher, *Overview of HIV*. Psychosom Med, 2008. **70**(5): p. 523-30.
11. Ganser-Pornillos, B.K., M. Yeager, and W.I. Sundquist, *The structural biology of HIV assembly*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(2): p. 203-17.
12. Campbell-Yesufu, O.T. and R.T. Gandhi, *Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(6): p. 780-7.
13. Dressler, S., *HIV/AIDS Taschenlexikon*. 2008: www.aidsfinder.org.
14. Taege, A., *Seek and treat: HIV update 2011*. Cleve Clin J Med, 2011. **78**(2): p. 95-100.
15. Potthoff, A.V. and N.H. Brockmeyer, *Current therapy of HIV*. J Dtsch Dermatol Ges, 2009.
16. Hammer, S.M., Eron, J. J., Jr., Reiss, P., Schooley, R. T., Thompson, M. A., Walmsley, S., Cahn, P., Fischl, M. A., Gatell, J. M., Hirsch, M. S., Jacobsen, D. M., Montaner, J. S., Richman, D. D., Yeni, P. G., and P. A. Volberding, *Anti-retroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel*. JAMA, 2008. **300**(5): p. 555-70.
17. Hughes, A., T. Barber, and M. Nelson, *New treatment options for HIV salvage patients: an overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists*. J Infect, 2008. **57**(1): p. 1-10.
18. Lewin, S.R., Evans, V. A., Elliott, J. H., Spire, B., and N. Chomont, *Finding a cure for HIV: will it ever be achievable?* J Int AIDS Soc, 2011. **14**: p. 4.
19. Sarkar, I., Hauber, I., Hauber, J., and F. Buchholz, *HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase*. Science, 2007. **316**(5833): p. 1912-5.

20. Barouch, D.H., *Challenges in the development of an HIV-1 vaccine*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 613-9.
21. McKinnon, L.R. and C.M. Card, *HIV vaccine efficacy trials: A brief history, and options for going forward*. AIDS Rev, 2010. **12**(4): p. 209-17.
22. Rappuoli, R. and A. Aderem, *A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria*. Nature, 2011. **473**(7348): p. 463-9.
23. Fauci, A.S., *25 years of HIV*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 289-90.
24. *Aspartic acid proteases as therapeutic targets*, ed. A.K. Ghosh. 2010, Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
25. Castro, H.C., Abreu, P. A., Geraldo, R. B., Martins, R. C., dos Santos, R., Loureiro, N. I., Cabral, L. M., and C. R. Rodrigues, *Looking at the proteases from a simple perspective*. J Mol Recognit, 2011. **24**(2): p. 165-81.
26. Navia, M.A., Fitzgerald, P. M., McKeever, B. M., Leu, C. T., Heimbach, J. C., Herber, W. K., Sigal, I. S., Darke, P. L., and J. P. Springer, *Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1*. Nature, 1989. **337**(6208): p. 615-20.
27. Brik, A. and C.H. Wong, *HIV-1 protease: mechanism and drug discovery*. Org Biomol Chem, 2003. **1**(1): p. 5-14.
28. Heaslet, H., Rosenfeld, R., Giffin, M., Lin, Y. C., Tam, K., Torbett, B. E., Elder, J. H., McRee, D. E., and C. D. Stout, *Conformational flexibility in the flap domains of ligand-free HIV protease*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007. **63**(Pt 8): p. 866-75.
29. Karthik, S. and S. Senapati, *Dynamic flaps in HIV-1 protease adopt unique ordering at different stages in the catalytic cycle*. Proteins, 2011. **79**(6): p. 1830-40.
30. Todd, M.J. and E. Freire, *The effect of inhibitor binding on the structural stability and cooperativity of the HIV-1 protease*. Proteins, 1999. **36**(2): p. 147-56.
31. Spinelli, S., Liu, Q. Z., Alzari, P. M., Hirel, P. H., and R. J. Poljak, *The three-dimensional structure of the aspartyl protease from the HIV-1 isolate BRU*. Biochimie, 1991. **73**(11): p. 1391-6.
32. Blum, A., Boettcher, J., Doerr, S., Heine, A., Klebe, G., and W. E. Diederich, *Two solutions for the same problem: Multiple binding modes of pyrrolidine-based HIV-1 protease inhibitors*. J Mol Biol, 2011. **410**(4): p. 745-55.
33. Prabu-Jeyabalan, M., E. Nalivaika, and C.A. Schiffer, *How does a symmetric dimer recognize an asymmetric substrate? A substrate complex of HIV-1 protease*. J Mol Biol, 2000. **301**(5): p. 1207-20.
34. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **27**(2): p. 157-62.
35. Wensing, A.M., N.M. van Maarseveen, and M. Nijhuis, *Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance*. Antiviral Res, 2009. **85**(1): p. 59-74.
36. Wlodawer, A. and J. Vondrasek, *Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1998. **27**: p. 249-84.
37. Schleifer, K.-J., *HIV-Protease-Hemmer: Entwicklung und Ausblick*. PharmuZ, 2000. **29**(6): p. 341-349.
38. Klebe, G., *Wirkstoffdesign*. 2 ed. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
39. Krohn, A., Redshaw, S., Ritchie, J. C., Graves, B. J., and M. H. Hatada, *Novel binding mode of highly potent HIV-proteinase inhibitors incorporating the (R)-hydroxyethylamine isostere*. J Med Chem, 1991. **34**(11): p. 3340-2.

40. Thaisrivongs, S., Skulnick, H. I., Turner, S. R., Strohbach, J. W., Tommasi, R. A., Johnson, P. D., Aristoff, P. A., Judge, T. M., Gammill, R. B., Morris, J. K., Romines, K. R., Chrusciel, R. A., Hinshaw, R. R., Chong, K. T., Tarpley, W. G., Poppe, S. M., Slade, D. E., Lynn, J. C., Horng, M. M., Tomich, P. K., Seest, E. P., Dolak, L. A., Howe, W. J., Howard, G. M., and K. D. Watenpaugh, *Structure-based design of HIV protease inhibitors: sulfonamide-containing 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic inhibitors*. J Med Chem, 1996. **39**(22): p. 4349-53.
41. Coffin, J.M., *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy*. Science, 1995. **267**(5197): p. 483-9.
42. Luque, I., Todd, M. J., Gomez, J., Semo, N., and E. Freire, *Molecular basis of resistance to HIV-1 protease inhibition: a plausible hypothesis*. Biochemistry, 1998. **37**(17): p. 5791-7.
43. Sousa, S.F., Tamames, B., Fernandes, P. A., and M. J. Ramos, *Detailed atomistic analysis of the HIV-1 protease interface*. J Phys Chem B, 2011. **115**(21): p. 7045-57.
44. Mildner, A.M., Rothrock, D. J., Leone, J. W., Bannow, C. A., Lull, J. M., Reardon, I. M., Sarcich, J. L., Howe, W. J., Tomich, C. S., and C. W. Smith, *The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties*. Biochemistry, 1994. **33**(32): p. 9405-13.
45. Rose, J.R., R. Salto, and C.S. Craik, *Regulation of autoproteolysis of the HIV-1 and HIV-2 proteases with engineered amino acid substitutions*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11939-45.
46. Kohl, N.E., Rothrock, D. J., Leone, J. W., Bannow, C. A., Lull, J. M., Reardon, I. M., Sarcich, J. L., Howe, W. J., Tomich, C. S., and C. W. Smith, *Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4686-90.
47. Guller, R., Binggeli, A., Breu, V., Bur, D., Fischli, W., Hirth, G., Jenny, C., Kansy, M., Montavon, F., Muller, M., Oefner, C., Stadler, H., Vieira, E., Wilhelm, M., Wostl, W., and H.P. Marki, *Piperidine-renin inhibitors compounds with improved physicochemical properties*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(10): p. 1403-8.
48. Oefner, C., Binggeli, A., Breu, V., Bur, D., Clozel, J. P., D'Arcy, A., Dorn, A., Fischli, W., Gruninger, F., Guller, R., Hirth, G., Marki, H., Mathews, S., M. Iler M, Ridley, R. G., Stadler, H., Vieira, E., Wilhelm, M., Winkler, F., and W. Wostl, *Renin inhibition by substituted piperidines: a novel paradigm for the inhibition of monomeric aspartic proteinases?* Chem Biol, 1999. **6**(3): p. 127-31.
49. Vieira, E., Binggeli, A., Breu, V., Bur, D., Fischli, W., Guller, R., Hirth, G., Marki, H. P., Muller, M., Oefner, C., Scalone, M., Stadler, H., Wilhelm, M., and W. Wostl, *Substituted piperidines--highly potent renin inhibitors due to induced fit adaptation of the active site*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(10): p. 1397-402.
50. Böttcher, J., *Structure-based development of secondary amines as aspartic protease inhibitors*. 2008: Marburg.
51. Hasewinkel, C., *Klonierung und Expression der Shigella-Pathogenitätsgene ipgE, ipgB2, ospD1 und ipaA mit Vinculin oder spa15*. 2006, Marburg.
52. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R.D. , and A. Bairoch, *Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server*. The Proteomics Protocols Handbook, 2005: p. 571– 607

53. Specker, E., *De novo-Design und Synthese neuer Leitstrukturen als Übergangszustandsmimetika zur selektiven Inhibition der HIV-1 Protease und Cathepsin D*. 2004: Marburg.
54. Toth, M.V. and G.R. Marshall, *A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease*. International Journal of Peptide & Protein Research, 1990. **36**(6): p. 544-50.
55. Feng, B.Y. and B.K. Shoichet, *A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 550-3.
56. Seidler, J., McGovern, S. L., Doman, T. N., and B. K. Shoichet, *Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs*. J Med Chem, 2003. **46**(21): p. 4477-86.
57. McGovern, S.L., Helfand, B. T., Feng, B., and B. K. Shoichet, *A specific mechanism of nonspecific inhibition*. J Med Chem, 2003. **46**(20): p. 4265-72.
58. Leatherbarrow, R.J., *GraFit Version 4.0*. 1998, Staines, U. K.: Erithacus Software Ltd.
59. Cheng, Y. and W.H. Prusoff, *Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction*. Biochemical Pharmacology, 1973. **22**: p. 3099-3108.
60. Blum, A., Böttcher, J., Sammet, B., Luksch, T., Heine, A., Klebe, G., and W. E. Diederich, *Achiral oligoamines as versatile tool for the development of aspartic protease inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008. **16**(18): p. 8574-86.
61. Nelson, D. and M. Cox, *Lehninger Biochemie*. Vol. 3. 2001, Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
62. Otwinowski, Z. and W. Minor, *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. Methods in Enzymology, Macromolecular Crystallography, part A, ed. C.W.J. Carter and R.M. Sweet. Vol. 276. 1997, New York: Academic Press.
63. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and R. J. Read, *Phaser Crystallographic Software*. Journal of Applied Crystallography, 2007. **40**: p. 658-674.
64. Blum, A., Boettcher, J., Heine, A., Klebe, G., and W. E. Diederich, *Structure-guided design of C2-symmetric HIV-1 protease inhibitors based on a pyrrolidine scaffold*. J Med Chem, 2008. **51**(7): p. 2078-87.
65. Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and P. H. Zwart, *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2010. **66**(Pt 2): p. 213-21.
66. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and K. Cowtan, *Features and development of Coot*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2010. **66**(Pt 4): p. 486-501.
67. SYBYL 8.0, Tripos International: 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA
68. *Collaborative Computational Project, Number 4*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 1994. **50**: p. 760-763.
69. Laskowski, R.A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and J. M. Thornton, *PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures*. Journal of Applied Crystallography, 1993. **26**: p. 283-291.
70. Martin, A.C.R. and C.T. Porter, *ProFit Version 3.1*.

71. McLachlan, A.D., *Rapid comparison of protein structures*. Acta Crystallogr A, 1982. **38**: p. 871-873.
72. Kantardjieff, K.A. and B. Rupp, *Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals*. Protein Sci, 2003. **12**(9): p. 1865-71.
73. Matthews, B.W., *Solvent content of protein crystals*. J Mol Biol, 1968. **33**(2): p. 491-7.
74. Sheriff, S., W.A. Hendrickson, and J.L. Smith, *Structure of myohemerythrin in the azidomet state at 1.7/1.3 Å resolution*. J Mol Biol, 1987. **197**(2): p. 273-96.
75. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3*, Schrödinger, LLC.
76. Bostrom, J., A. Hogner, and S. Schmitt, *Do structurally similar ligands bind in a similar fashion?* J Med Chem, 2006. **49**(23): p. 6716-25.
77. Reich, S.H., Melnick, M., Davies, J. F., 2nd, Appelt, K., Lewis, K. K., Fuhry, M. A., Pino, M., Trippe, A. J., Nguyen, D., and H. Dawson, *Protein structure-based design of potent orally bioavailable, nonpeptide inhibitors of human immunodeficiency virus protease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3298-302.
78. Sheldrick, G.M., *A short history of SHELX*. Acta Crystallogr A, 2008. **64**(Pt 1): p. 112-22.
79. Koch, C., Heine. A., and G. Klebe, *Radiation damage reveals promising interaction position*. J Synchrotron Radiation, 2011. **18**(in press).
80. Ennifar, E., Carpentier, P., Ferrer, J. L., Walter, P., and P. Dumas, *X-ray-induced debromination of nucleic acids at the Br K absorption edge and implications for MAD phasing*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002. **58**(Pt 8): p. 1262-8.
81. Robbins, A.H., Coman, R. M., Bracho-Sanchez, E., Fernandez, M. A., Gilliland, C. T., Li, M., Agbandje-McKenna, M., Wlodawer, A., Dunn, B. M., and R. McKenna, *Structure of the unbound form of HIV-1 subtype A protease: comparison with unbound forms of proteases from other HIV subtypes*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 3): p. 233-42.
82. Tozser, J., Bagossi, P., Weber, I. T., Louis, J. M., Copeland, T. D., and S. Oroszlan, *Studies on the symmetry and sequence context dependence of the HIV-1 proteinase specificity*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 16807-14.
83. Ho, D.D., Toyoshima, T., Mo, H., Kempf, D., Norbeck, D., Chen, C., Wideburg, N. E., Burt, S. T., Erickson, J. W., and M. K. Singh, *Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 variants with increased resistance to a C2-symmetric protease inhibitor*. J Virol, 1993. **68**(3): p. 2016-2020.
84. Prabu-Jeyabalan, M., E. Nalivaika, and C.A. Schiffer, *Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes*. Structure, 2002. **10**(3): p. 369-81.
85. Kroto, H.W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., and R. E. Smalley, *C60: Buckminsterfullerene*. Nature, 1985. **318**: p. 162-163.
86. Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., and M. Prato, *Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications*. Eur J Med Chem, 2003. **38**(11-12): p. 913-23.
87. Friedman, S.H., DeCamp, D. L., Sijbesma, R. P., Srdanov, G., Wudl, F., and G. L. Kenyon, *Inhibition of the HIV-1 protease by Fullerene derivatives: Model building studies and experimental verification*. J. Am. Chem. Soc., 1993. **115**: p. 6506-6509.
88. Marchesan, S., Da Ros, T., Spalluto, G., Balzarini, J., and M. Prato, *Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(15): p. 3615-8.

89. Durdagi, S., Supuran, C. T., Strom, T. A., Doostdar, N., Kumar, M. K., Barron, A. R., Mavromoustakos, T., and M. G. Papadopoulos, *In silico drug screening approach for the design of magic bullets: a successful example with anti-HIV fullerene derivatized amino acids*. J Chem Inf Model, 2009. **49**(5): p. 1139-43.
90. Marcorin, G.L., Da Ros, T., Castellano, S., Stefancich, G., Bonin, I., Miertus, S., and M. Prato, *Design and synthesis of novel [60]fullerene derivatives as potential HIV aspartic protease inhibitors*. Org Lett, 2000. **2**(25): p. 3955-8.
91. Benyamini, H., Shulman-Peleg, A., Wolfson, H. J., Belgorodsky, B., Fadeev, L., and M. Gozin, *Interaction of c(60)-fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment*. Bioconjug Chem, 2006. **17**(2): p. 378-86.
92. Andersson, T., Sundahl, M., Westman, G., and O. Wennerström, *Host-guest chemistry of fullerenes: A water-soluble complex between C70 and gamma-cyclodextrin*. Tetrahedron Letters, 1994. **35**(38): p. 7103-7106.
93. Klee, N., Linde, K., Lindemann, I., Klebe, G., and W. E. Diederich, *New inhibitors for an old target: Piperidines and pyrrolidines to block HIV-1 protease*, in *Frontiers in Medicinal Chemistry 2010*. 2010: Münster, Germany.
94. Lafont, V., Armstrong, A. A., Ohtaka, H., Kiso, Y., Mario Amzel, L., and E. Freire, *Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization*. Chem Biol Drug Des, 2007. **69**(6): p. 413-22.
95. Dunitz, J.D. and R. Taylor, *Organic fluorine hardly ever accepts hydrogen bonds*. Chem. Eur. J., 1997. **3**(1): p. 89-98.
96. Müller, K., C. Faeh, and F. Diederich, *Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition*. Science, 2007. **317**(5846): p. 1881-6.
97. Cleland, W.W., *Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups*. Biochemistry, 1963: p. 480-482.
98. Klee, N., Lindemann, I., Klebe, G., and W. E. Diederich, *Pyrrolidine based bi-cycles: A promising new scaffold for HIV protease inhibitors*, in *5th Summer School "Medicinal Chemistry"*. 2010: Regensburg, Germany.
99. de Kloe, G.E., Bailey, D., Leurs, R., and I. J. de Esch, *Transforming fragments into candidates: small becomes big in medicinal chemistry*. Drug Discov Today, 2009. **14**(13-14): p. 630-46.
100. Erlanson, D.A., *Fragment-based lead discovery: a chemical update*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(6): p. 643-52.
101. Erlanson, D.A., R.S. McDowell, and T. O'Brien, *Fragment-based drug discovery*. J Med Chem, 2004. **47**(14): p. 3463-82.
102. Köster, H., Craan, T., Brass, S., Herrhaus, C., Zentgraf, M., Heine, A., and G. Klebe, *A small non-rule of 3 compatible fragment library provides high hit rate of endothiapepsin crystal structures with various fragment chemotypes*. J Med Chem, in press
103. Huth, J.R., Park, C., Petros, A. M., Kunzer, A. R., Wendt, M. D., Wang, X., Lynch, C. L., Mack, J. C., Swift, K. M., Judge, R. A., Chen, J., Richardson, P. L., Jin, S., Tahir, S. K., Matayoshi, E. D., Dorwin, S. A., Lador, U. S., Severin, J. M., Walter, K. A., Bartley, D. M., Fesik, S. W., Elmore, S. W., and P. J. Hajduk, *Discovery and design of novel HSP90 inhibitors using multiple fragment-based design strategies*. Chem Biol Drug Des, 2007. **70**(1): p. 1-12.
104. Perryman, A.L., Zhang, Q., Soutter, H. H., Rosenfeld, R., McRee, D. E., Olson, A. J., Elder, J. E., and C. D. Stout, *Fragment-based screen against HIV protease*. Chem Biol Drug Des, 2010. **75**(3): p. 257-68.
105. Dewar, D., S.P. Pereira, and P.J. Ciclitira, *The pathogenesis of coeliac disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(1): p. 17-24.
106. Rodrigo, L., *Celiac disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(41): p. 6585-93.

107. Koning, F., *Celiac disease: caught between a rock and a hard place*. Gastroenterology, 2005. **129**(4): p. 1294-301.
108. Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O., and D. Schuppan, *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 797-801.
109. Piper, J.L., G.M. Gray, and C. Khosla, *High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: implications for celiac sprue*. Biochemistry, 2002. **41**(1): p. 386-93.
110. Siegel, M., Bethune, M. T., Gass, J., Ehren, J., Xia, J., Johannsen, A., Stuge, T. B., Gray, G. M., Lee, P. P., and C. Khosla, *Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue*. Chem Biol, 2006. **13**(6): p. 649-58.
111. Griffin, M., R. Casadio, and C.M. Bergamini, *Transglutaminases: nature's biological glues*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 2): p. 377-96.
112. Beninati, S. and M. Piacentini, *The transglutaminase family: an overview: mini-review article*. Amino Acids, 2004. **26**(4): p. 367-72.
113. Mehta, K., *Mammalian Transglutaminases: A family portrait*, in *Transglutaminases*, K. Mehta and R. Eckert, Editors. 2005: Basel. p. 1-18.
114. Liu, S., R.A. Cerione, and J. Clardy, *Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2743-7.
115. Han, B.G., Cho, J. W., Cho, Y. D., Jeong, K. C., Kim, S. Y., and B. I. Lee, *Crystal structure of human transglutaminase 2 in complex with adenosine triphosphate*. Int J Biol Macromol, 2010. **47**(2): p. 190-5.
116. Vollmar, M., Krysztofinska, E., Krojer, T., Yue, W. W., Cooper, C., Kavanagh, K., Allerston, C., Chaikuad, A., Von Delft, F., Arrowsmith, C. H., Weigelt, J., Edwards, A., Bountra, C., and U. Oppermann, *Crystal structure of the human transglutaminase 1 beta-barrel domain*. to be published.
117. Ahvazi, B., Boeshans, K. M., Idler, W., Baxa, U., and P. M. Steinert, *Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23834-41.
118. Ahvazi, B., Kim, H. C., Kee, S. H., Nemes, Z., P. M. Steinert, *Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation*. EMBO J, 2002. **21**(9): p. 2055-67.
119. Yee, V.C., Pedersen, L. C., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E., D. C. Teller, *Structural evidence that the activation peptide is not released upon thrombin cleavage of factor XIII*. Thromb Res, 1995. **78**(5): p. 389-97.
120. Fox, B.A., Yee, V. C., Pedersen, L. C., Le Trong, I., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E., and D. C. Teller, *Identification of the calcium binding site and a novel yttrium site in blood coagulation factor XIII by x-ray crystallography*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 4917-23.
121. Yee, V.C., Pedersen, L. C., Le Trong, I., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E., and D. C. Teller, *Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7296-300.
122. Weiss, M.S., H.J. Metzner, and R. Hilgenfeld, *Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function*. FEBS Lett, 1998. **423**(3): p. 291-6.
123. Garzon, R.J., Pratt, K. P., Bishop, P. D., Le Trong, I., Stenkamp, R. E., and D. C. Teller, *Tryptophan 279 is essential for the transglutaminase activity of coagulation factor XIII: Functional and structural characterization*. to be published.

124. Chen, J.S. and K. Mehta, *Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(8): p. 817-36.
125. Tovar-Vidales, T., A.F. Clark, and R.J. Wordinger, *Focus on molecules: transglutaminase 2*. Exp Eye Res, 2010. **93**(1): p. 2-3.
126. Mariani, P., Carsughi, F., Spinozzi, F., Romanzetti, S., Meier, G., Casadio, R., and C. M. Bergamini, *Ligand-induced conformational changes in tissue transglutaminase: Monte Carlo analysis of small-angle scattering data*. Biophys J, 2000. **78**(6): p. 3240-51.
127. Koning, F., *A tertiary twist to the transglutaminase tale*. PLoS Biol, 2007. **5**(12): p. e337.
128. Siegel, M. and C. Khosla, *Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states*. Pharmacol Ther, 2007. **115**(2): p. 232-45.
129. Griffin, M., Mongeot, A., Collighan, R., Saint, R. E., Jones, R. A., Coutts, I. G., and D. L. Rathbone, *Synthesis of potent water-soluble tissue transglutaminase inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(20): p. 5559-62.
130. Choi, K., Siegel, M., Piper, J. L., Yuan, L., Cho, E., Strnad, P., Omary, B., Rich, K. M., and C. Khosla, *Chemistry and biology of dihydroisoxazole derivatives: selective inhibitors of human transglutaminase 2*. Chem Biol, 2005. **12**(4): p. 469-75.
131. Hausch, F., Halttunen, T., Maki, M., and C. Khosla, *Design, synthesis, and evaluation of gluten peptide analogs as selective inhibitors of human tissue transglutaminase*. Chem Biol, 2003. **10**(3): p. 225-31.
132. Schaertl, S., Prime, M., Wityak, J., Dominguez, C., Munoz-Sanjuan, I., Pacifici, R. E., Courtney, S., Scheel, A., and D. Macdonald, *A profiling platform for the characterization of transglutaminase 2 (TG2) inhibitors*. J Biomol Screen, 2010. **15**(5): p. 478-87.
133. Moriarty, N.W., R.W. Grosse-Kunstleve, and P.D. Adams, *electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2009. **65**(Pt 10): p. 1074-80.
134. Hutchinson, E.G. and J.M. Thornton, *PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins*. Protein Sci, 1996. **5**(2): p. 212-20.
135. Afonine, P.V., R.W. Grosse-Kunstleve, and P.D. Adams, *A robust bulk-solvent correction and anisotropic scaling procedure*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005. **61**(Pt 7): p. 850-5.
136. Sheriff, S. and W.A. Hendrickson, *Description of overall anisotropy in diffraction from macromolecular crystals*. Acta Crystallogr A, 1987. **43**: p. 118-121.
137. Strong, M., Sawaya, M. R., Wang, S., Phillips, M., Cascio, D., and D. Eisenberg, *Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8060-5.
138. Matthews, B.W., *The γ Turn. Evidence for a new folded conformation in proteins*. Macromolecules, 1972. **5**(6): p. 818-819.
139. Mertens, H.D. and D.I. Svergun, *Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering*. J Struct Biol, 2010. **172**(1): p. 128-41.
140. Stamnaes, J., Pinkas, D. M., Fleckenstein, B., Khosla, C., and L. M. Sollid, *Redox regulation of transglutaminase 2 activity*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25402-9.

141. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., and R. Taylor, *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. J Mol Biol, 1997. **267**(3): p. 727-48.
142. Lindvall, M.K., *Molecular modeling in cysteine protease inhibitor design*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(18): p. 1673-81.
143. Mousa, S.A., *Novel anticoagulant therapy: principle and practice*. Methods Mol Biol, 2010. **663**: p. 157-79.
144. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. 2005, München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer.
145. Roth, H.J. and H. Fenner, *Arzneistoffe*. Vol. 3. 2000, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
146. Muszbek, L., Bagoly, Z., Bereczky, Z., and E. Katona, *The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2008. **6**(3): p. 190-205.
147. Sicker, T. and R. Hilgenfeld, *[Blood coagulation factor XIII: activation, substrates and structure of a transglutaminase]*. Hamostaseologie, 2002. **22**(1): p. 20-7.
148. Ichinose, A., *Extracellular Transglutaminase: Factor XIII*, in *Transglutaminases*, K. Mehta and R. Eckert, Editors. 2005: Basel. p. 192-208.
149. Mutschler, E., et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Vol. 8. 2001, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
150. Komaromi, I., Z. Bagoly, and L. Muszbek, *Factor XIII: novel structural and functional aspects*. J Thromb Haemost, 2010. **9**(1): p. 9-20.
151. Muszbek, L., V.C. Yee, and Z. Hevessy, *Blood coagulation factor XIII: structure and function*. Thromb Res, 1999. **94**(5): p. 271-305.
152. Sicker, T., *Strukturelle Untersuchungen von Blutgerinnungsfaktor XIII*. 2008: Jena.
153. Andersen, M.D. and J.H. Faber, *Structural characterization of both the non-proteolytic and proteolytic activation pathways of coagulation Factor XIII studied by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry*. Int. J. Mass. Spectrom., 2011. **302**(1-3): p. 139-148.
154. Pedersen, L.C., Yee, V. C., Bishop, P. D., Le Trong, I., Teller, D. C., and R. E. Stenkamp, *Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules*. Protein Sci, 1994. **3**(7): p. 1131-5.
155. Penzes, K., Kover, K. E., Fazakas, F., Haramura, G., and L. Muszbek, *Molecular mechanism of the interaction between activated factor XIII and its glutamine donor peptide substrate*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(4): p. 627-33.
156. Prasa, D. and J. Sturzebecher, *[Inhibitors of factor XIIIa]*. Hamostaseologie, 2002. **22**(1): p. 43-7.
157. Cleary, D.B., Doiphode, P. G., Sabo, T. M., and M. C. Maurer, *A non-reactive glutamine residue of alpha2-antiplasmin promotes interactions with the factor XIII active site region*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(11): p. 1947-9.
158. Freund, K.F., Doshi, K. P., Gaul, S. L., Claremon, D. A., Remy, D. C., Baldwin, J. J., Pitzenberger, S. M., and A. M. Stern, *Transglutaminase inhibition by 2-[(2-oxopropyl)thio]imidazolium derivatives: mechanism of factor XIIIa inactivation*. Biochemistry, 1994. **33**(33): p. 10109-19.
159. Seale, L., Finney, S., Sawyer, R. T., and R. B. Wallis, *Tridegin, a novel peptidic inhibitor of factor XIIIa from the leech, Haementeria ghilianii, enhances fibrinolysis in vitro*. Thromb Haemost, 1997. **77**(5): p. 959-63.
160. Otto, H.H. and T. Schirmeister, *Cysteine Proteases and Their Inhibitors*. Chem Rev, 1997. **97**(1): p. 133-172.

161. Powers, J.C., Asgian, J. L., Ekici, O. D., and K. E. James, *Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases*. Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4639-750.
162. Jain, E., Bairoch, A., Duvaud, S., Phan, I., Redaschi, N., Suzek, B. E., Martin, M. J., McGarvey, P., and E. Gasteiger, *Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 136.
163. Altschul, S.F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and D. J. Lipman, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
164. Schlegel, B., Laggner, C., Meier, R., Langer, T., Schnell, D., Seifert, R., Stark, H., Holtje, H. D., and W. Sippl, *Generation of a homology model of the human histamine H(3) receptor for ligand docking and pharmacophore-based screening*. J Comput Aided Mol Des, 2007. **21**(8): p. 437-53.

Publikationen

Poster

Lindemann, I., J. Böttcher, K. Oertel, J. Weber, M. Hils, R. Pasternack, U. Linne, A. Heine, and G. Klebe, *Inhibitors of transglutaminase 2: A therapeutic option in celiac disease*, in *International symposium on medicinal chemistry EFMC-ISMIC*. 2008: Vienna, Austria

Lindemann, I., J. Böttcher, K. Oertel, J. Weber, M. Hils, R. Pasternack, U. Linne, A. Heine, and G. Klebe, *Transglutaminase 2 as a target for structure-based drug design: New therapeutic options in celiac disease*, in *PharmSciFair*. 2009: Nice, France

Klee, N., I. Lindemann, G. Klebe, and W. E. Diederich, *Pyrrolidine based bicycles: A promising new scaffold for HIV protease inhibitors*, in *5th Summer School "Medicinal Chemistry"*. 2010: Regensburg, Germany.

Klee, N., K. Linde, I. Lindemann, G. Klebe, and W. E. Diederich, *New inhibitors for an old target: Piperidines and pyrrolidines to block HIV-1 protease*, in *Frontiers in Medicinal Chemistry*. 2010: Münster, Germany.

Vortrag

Lindemann, I., J. Böttcher, K. Oertel, J. Weber, M. Hils, R. Pasternack, U. Linne, A. Heine, and G. Klebe, *Inhibitors of transglutaminase 2: A therapeutic option in celiac disease*, in *Pre-Satellite Meeting of the PharmSciFair*. 2009: Nice, France

Danksagung

Für die Unterstützung während meiner Promotionszeit möchte ich einigen Menschen Danke sagen:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Klebe für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und insbesondere für die Freiheit in der Gestaltung der Arbeit. Wenn ich dann doch mal allein nicht weiter wusste, hatte er stets ein offenes Ohr und gute Ideen.

Prof. Dr. Torsten Steinmetzer für die Anfertigung des Zweitgutachtens und die Zusammenarbeit im Faktor XIII – Projekt.

Dr. Andreas Heine für die Unterstützung bei der Sammlung und Auswertung der röntgenkristallographischen Daten und seine stete Hilfsbereitschaft.

Christian Sohn für seine technische Unterstützung bei Arbeiten am Röntgendiffraktometer und seine Unverwechselbarkeit.

Petra Gnau und dem Rest der Arbeitsgruppe Essen für die Unterstützung bei der Arbeit am Kristallisationsroboter.

Lydia Hartleben und Angela Scholz für ihre umfassende Hilfe in organisatorischen Angelegenheiten.

Johannes Weber, Dr. Martin Hils und Dr. Ralf Pasternack von der ZEDIRA GmbH für die Kooperation im Transglutaminase 2 – und Faktor XIII – Projekt.

Dr. Kai Oertel für die Synthese der Inhibitoren der Transglutaminase 2 und, auch bei Dr. Sabine Urig, für die gute Zusammenarbeit.

Sven, Gerd, Micha, Andy, Sergej, Tobi und Felix für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Computernotfällen.

Jark dafür, dass er sich viel Zeit genommen hat, mich einzuarbeiten, und auch später immer noch für Fragen zur Verfügung stand.

Meinen Kollegen Inna, Adam, Stephan, Barbara, Manu und Conny für eine produktive Zusammenarbeit und ihre Freundschaft.

Helene dafür, dass sie die beste Bürokollegin war, die ich mir vorstellen kann.

Meiner Mutter und meiner Großmutter für Hilfe in allen Lebenslagen.

Meinen Freunden, insbesondere Caro, Katrin, Annika, Claudi, Marion, Diana und Paul.

Lars und Ruth für ihre Liebe und dafür, dass sie immer zu mir gehalten haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Strukturbasiertes Wirkstoffdesign am Beispiel der Zielproteine HIV-1 Protease, Transglutaminase 2 und Faktor XIII“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 30.10.2011

Ina Lindemann

Lebenslauf

Persönliche Daten

Ina Lindemann	Name
25.02.1982	Geburtsdatum
Peine	Geburtsort
deutsch	Staatsangehörigkeit

Schulausbildung

Gymnasium Duderstadt	1994 – 2001
Abitur	2001

Hochschulausbildung

Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg	2001 – 2006
3. Staatsexamen und Approbation zur Apothekerin	2007

Promotion

Institut für Pharmazeutische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Klebe, Universität Marburg Thema: Strukturbasiertes Wirkstoffdesign am Beispiel der Zielproteine HIV-1 Protease, Transglutaminase 2 und Faktor XIII	2007 – 2011
--	-------------

Berufstätigkeit

Lilly Pharma Fertigung und Distribution, Giessen	seit 11 / 2011
Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker, Eschborn	06 – 10 / 2011
Schlossberg-Apotheke, Marburg	
Pharmaziepraktikum	2006 – 2007
Nebenberufliche Tätigkeit als Apothekerin	2007 – 2011